

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (UAM)

**GENERACIÓN DE UN FRAGMENTO RECOMBINANTE  
DEL BRAZO LARGO DE LA LAMININA 111.  
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL**

PATRICIA SANTOS VALLE

Licenciada en Biología

DIRECTORES: DR. LUIS ÁLVAREZ VALLINA

DRA. LAURA SANZ ALCOBER

HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO

MAJADAHONDA



El Dr. Luis Álvarez Vallina, Jefe de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y Profesor Honorario del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y la Dra. Laura Sanz Alcober, Investigadora de la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado **Generación de un fragmento recombinante del brazo largo de la laminina 111. Caracterización estructural y funcional** que presenta PATRICIA SANTOS VALLE para la obtención del GRADO DE DOCTOR por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y reúne las condiciones de calidad, contenido y forma flexibles para ser presentado ante el tribunal correspondiente.

Para que conste a los efectos oportunos, expide el presente certificado en Majadahonda a 10 de febrero de 2012.

Dra. Benilde Jiménez Cuenca	Dr. Luis Álvarez Vallina	Dra. Laura Sanz Alcober
Tutora de tesis	Director de tesis	Directora de tesis
Profesora Titular		
Departamento de Bioquímica		
Universidad Autónoma de Madrid		



Esta Tesis Doctoral, realizada en la Unidad de Inmunología Molecular del Hospital Universitario Puerta de Hierro, ha sido financiada por la Fundación Mutua Madrileña, el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BIO2008-03233) y el Fondo de Investigación Sanitaria (PS09/00227).

Patricia Santos Valle ha disfrutado de una beca de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (2008) dentro del programa de Formación de Personal Investigador.



## AGRADECIMIENTOS





Pensé que una vez escrita la tesis, este apartado sería “coser y cantar” pero como tantas otras veces en la vida me equivoqué. Así que para romper el hielo busqué una definición que englobase todo lo que pretende significar para mí esta simple palabra, tan habitualmente empleada; y encontré ésta “AGRADECIMIENTO: La memoria del corazón” (Anónimo). Lo cual, cómo podéis imaginar, me complicó aún más la tarea de iniciar este apartado, pues los muchos o pocos que me conocéis sabéis lo difícil que resulta expresar, con palabras, las muestras de gratitud, además de que a veces mi memoria puede jugar alguna que otra mala pasada y no quisiera dejarme a nadie en el tintero. Por eso antes de empezar pido DISCULPAS anticipadas, por aquellos que sin proponérmelo he olvidado mencionar.

En primer lugar quiero agradecer enormemente a mis directores de tesis el Dr. Luís Álvarez Vallina y la Dra. Laura Sanz Alcober el haberme dado la oportunidad de poder entrar a formar parte de su grupo de investigación y poder así realizar la tesis doctoral, que era mi sueño desde que empecé la carrera de ciencias y de obstáculos. Al Dr. Luís Álvarez Vallina en especial por sus consejos, sus críticas y sobre todo por no haber perdido la fe en un proyecto que tardó en dar sus frutos. A la Dra. Laura Sanz Alcober por facilitarme citas, protocolos, y especialmente por enseñarme en los primeros meses de mi llegada. Os agradezco que hayáis creído en mí.

En segundo lugar quisiera agradecer a mis primeros compañeros de batalla y/o poyata por su cálida acogida en el laboratorio. Fue muy satisfactorio el encontrarme y re-encontrarme con personas como Marta, Ángel (ACME), Vanesa, David y Ana. No sólo me hicieron madurar sino que descubrí en ellos la sensatez, la paciencia, la sensibilidad, la inteligencia, el desparpajo que tan necesarios pueden resultar en la vida. Compartimos muchos momentos, no siempre extraordinarios, en un espacio bastante reducido dónde muchas veces la única luz que entraba era la de vuestra compañía.

Con mucho sacrificio conseguisteis hacer vuestro, nuestro.... de todos el nuevo laboratorio de Majadahonda, dejando cabida a nuevos compañeros/amigos que estaban por llegar, y de los que sin saberlo, habría muchas cosas que aprender y admirar.

Fiel reflejo de que un pequeño envoltorio puede albergar un gran contenido me lo han demostrado personas como Irene Guijarro, Emma y Celia. Cuánta preparación, interés y

## AGRADECIMIENTOS

madurez en todo lo que hacen, sin perder ni un instante la sonrisa y vitalidad que les caracteriza.

He tenido el gusto de cruzarme en el camino con “personajes” tan asombrosos, como Nuria, Rodrigo y Elena, compañeros de gran valentía, seguridad y sobre todo afán de superación que le dejan a una sin aliento. CHICOS A VUESTRO LADO UNA SE SIENTE PEQUEÑA!!!

En los últimos años de tesis tengo que agradecer enormemente a Ana Blanco e Irene Molina, el apoyo fundamental que me han prestado. No sólo han sido buenas compañeras tanto dentro como fuera del laboratorio, sino que ha empezado a florecer un sentimiento de amistad, que SINCERAMENTE me gustaría poder conservar más allá de estos muros. CHICAS ME HABÉIS ENCANDILADO!!!

Finalmente quiero citar a personas que ya no están en el laboratorio que de manera más breve dejaron su huella en mí, por eso no me quiero olvidar de Marta Sánchez, Noelia, María Rodríguez ni Nanna.

He de decir que sin ninguno de vosotros lo más seguro que este proyecto no hubiera sido posible, agradezco las “regañinas”, las críticas, los ánimos, las ayudas INFINITAS... en fin GRACIAS es lo más sensato que se me ocurre decir.

En tercer lugar me gustaría agradecer a nuestros compañeros del laboratorio vecino de Inmunología David Ordoñez, Manuela, Elisa, Kelly, Karina especialmente por amenizarnos la hora de la comida, compartir apagones, entender que la ciencia no es el camino más fácil y saber que al menos no estamos solos en este mundo.

A nuestros compañeros del laboratorio de Oncología Médica, especialmente por darnos calor y compañía sobre todo cuando todavía estábamos en el primer Puerta de Hierro y dejarnos usar alguno de vuestros aparatos y dejarnos alguno en herencia, José Miguel, Gema, Javi, Vanesa, Cristina, Yolanda, Irene, Coral, Mercedes, Alberto, Bea, Marta, Esther, Raquel (espero no olvidarme de nadie) HA SIDO UN PLACER cruzarme en vuestro camino.

He de mencionar con especial gratitud la labor fundamental que ha realizado Cristina Escudero, sin ella no hubiera podido acceder a mucha bibliografía, por no decir a casi ninguna, además del cariño e interés con el que siempre me ha tratado y nos ha tratado en general. Ha sido y es uno de los pilares fundamentales de este hospital.

Personal imprescindible del hospital, Sonia y Candelas, por hacer la vida en el hospital mucho más fácil y sin cuya ayuda nunca habiéramos entregado ni impreso a tiempo mucha documentación.

Personas como el Dr. Francisco Blanco, Antoñuco y M<sup>o</sup> José que me han ayudado con técnicas y procedimientos claves en la elaboración de la tesis. Gracias por vuestro tiempo, dedicación y profesionalidad.

A todas las personas con las que he compartido momentos de aireamiento mental... que no pulmonar, que han compartido lluvias, temporales, calores y que con el tiempo he llegado a apreciar y a los que agradezco el interés que han mostrado por mi persona entre los que destacan especialmente M<sup>a</sup> Jesús, Silvia, Pilar, Margarita, Carmen, Celia, Laura, Marta.

En cuarto lugar, y no por eso menos importante, agradecer a mis padres, Roberto y Carmen, el haberme dado todo lo necesario y más para poder dedicarme a lo que quería, aún sin conocer en qué dedicaba mi tiempo y el vuestro, pues reconozco que estos años también os he robado el que no me pertenecía. Habéis hecho todo lo que está en vuestras manos para hacer de mí alguien que merezca la pena, espero no haberos defraudado demasiado, si así ha sido, respirar tranquilos porque vuestra no es la culpa.

A mis hermanas Laura, Silvia e Iria, porque me habéis enseñado que no sólo la sangre hace latir un corazón. Gracias por estar donde siempre se os puede encontrar. SOIS LAS MEJORES HERMANAS QUE UNA PUEDE TENER!!.

A Oscar, familia política pero sobre todo un amigo. Admiro tu sencillez, tu transparencia, tu honradez, tu fidelidad.... En fin la lista es interminable. No sólo enamoraste a mi hermana... Me enorgullezco de ser tu cuñada, tu amiga.

## AGRADECIMIENTOS

A Adriana, mi ahijada, mi sobrina, mi salvavidas, mi sol. A ella fue a la única personita a la que no pude rechazar durante la elaboración de mi tesis. Por ser de los momentos más felices de mi vida.

A mi familia, tíos, primos, abuela, por vuestro apoyo y preguntar siempre aunque sea desconocido para vosotros. A mis abuelos que desgraciadamente ya no se encuentran con nosotros, pero que su cariño fue imprescindible en los primeros años de mi vida.

A mis perros Troska y Whiski por enseñarme lo que es la lealtad, sacar la chiquilla que llevo dentro.

A mis amigos Fátima, Sara Guerrero, Cris, Beñat, Denise, Rubén, Bea, Lourdes, Jorge, Sara simplemente por estar ahí, por hacerme crecer, por querer conocerme, por aceptarme como soy.... EN FIN POR SER COMO SOIS. Perdonarme porque sé que sois el tesoro que últimamente he dejado guardado bajo llave por mis propios temores!!! Sé lo que valéis eso no lo cambia crisis alguna!!!

Y quisiera agradecer a Jesús, gran amigo y compañero, me diste esperanzas cuando las creía perdidas, contigo aprendí a sonreír de nuevo.

Finalmente termino con un simple GRACIAS porque “A este ser humano le habéis salvado entre todos vosotros”

## RESUMEN



## GENERACIÓN DE UN FRAGMENTO RECOMBINANTE DEL BRAZO LARGO DE LA LAMININA 111. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL

Las lamininas son grandes glicoproteínas heterotríméricas que forman parte esencial de la matriz extracelular. Tienen forma cruciforme con dominios globulares terminales y una región *coiled-coil* a través de la cual las tres cadenas se unen de forma covalente. Las lamininas son componentes fundamentales de las membranas basales, y proporcionan sitios de unión que median adhesión celular, migración y proliferación. En este trabajo hemos generado un fragmento recombinante que comprende la región *coiled-coil* completa de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ , que se ensambla formando un heterotrímero estable independientemente del resto de la molécula. Este dominio es biológicamente activo, y no solo no sirve como sustrato para la adhesión celular sino que también inhibe la adhesión a laminina intacta cuando se añade de forma soluble. Es más, el perfil de expresión génica de células cultivadas en presencia del dominio *coiled-coil* demuestra el incremento en la expresión de genes implicados en motilidad celular e invasión. Estos resultados fueron confirmados mediante PCR cuantitativa en tiempo real y ensayos de zimografía. En conclusión, este estudio muestra por primera vez que el dominio *coiled-coil* de laminina-111 tiene efecto anti-adhesivo y revela potenciales implicaciones en el proceso de migración celular durante la remodelación de la matriz extracelular.

## GENERATION OF A RECOMBINANT FRAGMENT OF THE LONG ARM OF LAMININ 111. STRUCTURAL AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION

Laminins are large heterotrimeric cross-shaped extracellular matrix glycoproteins with terminal globular domains and a coiled-coil region through which the three chains are assembled and covalently linked. Laminins are key components of basement membranes, and they serve as attachment sites for cell adhesion, migration and proliferation. In this work, we produced a recombinant fragment comprising the entire laminin coiled-coil of the  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ - and  $\gamma 1$ -chains that assemble into a stable heterotrimeric coiled-coil structure independently of the rest of the molecule. This domain was biologically active and not only failed to serve as a substrate for cell attachment, spreading and focal adhesion formation but also inhibited cell adhesion to laminin when added to cells in a soluble form at the time of seeding. Furthermore, gene array expression profiling in cells cultured in the presence of the laminin coiled-coil domain revealed up-regulation of genes involved in cell motility and invasion. These finding were confirmed by quantitative real-time PCR and zymography assays. In conclusion, this study shows for the first time that the laminin coiled-coil domain displays anti-adhesive functions and has potential implications for cell migration during matrix remodeling.





# ÍNDICE



<b>ÍNDICE</b>	<b>17</b>
<b>CLAVE DE ABREVIATURA</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>27</b>
<b>1. MATRIZ EXTRACELULAR</b>	<b>29</b>
<b>2. MEMBRANA BASAL</b>	<b>30</b>
2.1. Estructura y función	30
2.2. Componentes	31
2.2.1. Colágenos	31
2.2.1.1. Colágeno IV	31
2.2.1.2. Colágeno XV	32
2.2.1.3. Colágeno XVIII	32
2.2.2. Lamininas	32
2.2.3. Nidógenos/Entactinas	33
2.2.4. Perlecano	34
2.2.5. Agrina	35
2.2.6. Fibulinas	35
2.2.7. Netrinas	35
<b>3. LAMININA</b>	<b>36</b>
3.1. Estructura y función	36
3.2. Ensamblaje de la membrana basal	41
3.3. Implicaciones fisiopatológicas	44
3.3.1. Desarrollo embrionario	44
3.3.2. Organogénesis	45
3.3.2.1. Sistema urinario	45
3.3.2.2. Sistema neuromuscular	45
3.3.2.3. Piel y anejos cutáneos	46
3.3.3. Angiogénesis	46
3.4. Oportunidades de intervención terapéutica	47
<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>1. CÉLULAS PRIMARIAS Y LÍNEAS CELULARES</b>	<b>57</b>
<b>2. CONSTRUCCIONES GÉNICAS</b>	<b>57</b>
2.1. Vectores de expresión	58
2.1.1. Vectores de expresión que codifican variantes truncadas de la cadena $\alpha 1$	58
2.1.2. Vectores de expresión que codifican variantes truncadas de la cadena $\beta 1$	60

2.1.3. Vectores de expresión que codifican variantes truncadas de la cadena $\gamma 1$	61
<b>3. TRANSFECCIONES</b>	<b>62</b>
<b>4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO TRUNCADO HETEROTRIMÉRICO <math>\alpha\beta\gamma</math> (<math>\alpha\beta\gamma 1</math>)</b>	<b>62</b>
<b>5. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)</b>	<b>63</b>
5.1. ELISAs para la detección de variantes truncadas $\alpha 1$ , $\beta 1$ , o $\gamma 1$ individuales	63
5.2. ELISA para la detección de variantes truncadas $\alpha 1$ - $\beta 1$ o $\beta 1$ - $\gamma 1$ asociadas	63
5.3. ELISA para la caracterización inmunológica del $\alpha\beta\gamma 1$	63
<b>6. TRANSFERENCIA <i>WESTERN</i></b>	<b>64</b>
<b>7. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL <math>\alpha\beta\gamma 1</math> PURIFICADO</b>	<b>64</b>
7.1. Curvas de dicroísmo circular (DC)	64
7.2. Curvas de estabilidad térmica	65
7.3. Purificación <i>MultiAngle Laser Scattering</i> (MALLs)	65
<b>8. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL <math>\alpha\beta\gamma 1</math> PURIFICADO</b>	<b>65</b>
8.1. Ensayos de inmunofluorescencia	65
8.2. Ensayos de adhesión celular	66
8.3. Ensayos de inhibición de la adhesión celular	66
8.4. Ensayos de <i>cell rounding</i>	66
8.5. Ensayos de reorganización del citoesqueleto	67
8.6. Ensayos de proliferación celular	67
8.7. Ensayos de ciclo celular	67
<b>9. ESTUDIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL</b>	<b>68</b>
9.1. Aislamiento de ARN total	68
9.2. <i>Microarrays</i> de ADN	68
9.3. Validación de los resultados de los <i>microarrays</i> de ADN mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	68
<b>10. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN FUNCIONAL</b>	<b>69</b>
10.1. Ensayos de migración celular	69
10.2. Ensayos de invasión celular	70
10.3. Ensayos de zimografía	70
<b>11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>70</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>73</b>
<b>1. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN VARIANTES TRUNCADAS DE LA CADENA <math>\alpha 1</math></b>	<b>75</b>

1.1. Diseño de construcciones génicas que comprende la región <i>coiled-coil</i> y tres dominos tipo laminina <i>EGF-like</i> de la cadena $\alpha 1$	75
1.1.1. Construcción de vectores de expresión eucariota para la secreción de variantes truncadas de la cadena $\alpha 1$ ( $t\alpha 1$ )	77
1.1.2. Producción y caracterización de la cadena $t\alpha 1$	78
<b>2. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN VARIANTES TRUNCADAS DE LA CADENA <math>\beta 1</math></b>	<b>79</b>
2.1. Diseño de construcciones génicas que comprende la región <i>coiled-coil</i> y tres dominos tipo laminina <i>EGF-like</i> de la cadena $\beta 1$	79
2.1.1. Construcción de vectores de expresión eucariota para la secreción de variantes truncadas de la cadena $\beta 1$ ( $t\beta 1$ )	81
2.1.2. Producción y caracterización de la cadena $t\beta 1$	82
<b>3. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN VARIANTES TRUNCADAS DE LA CADENA <math>\gamma 1</math></b>	<b>82</b>
3.1. Diseño de construcciones génicas que comprende la región <i>coiled-coil</i> y dos dominos tipo laminina <i>EGF-like</i> de la cadena $\gamma 1$	82
3.1.1. Construcción de vectores de expresión eucariota para la secreción de variantes truncadas de la cadena $\gamma 1$ ( $t\gamma 1$ )	83
3.1.2. Producción y caracterización de la cadena $t\gamma 1$	84
<b>4. PRODUCCION DE UN FRAGMENTO HETEROTRIMÉRICO <math>\alpha\beta\gamma</math> TRUNCADO (<math>t\alpha\beta\gamma 1</math>)</b>	<b>85</b>
4.1. Generación de transfectantes transitorios en células 293F, con los vectores que codifican las cadenas $t\alpha 1$ , $t\beta 1$ y $t\gamma 1$	85
4.2. Purificación del fragmento $t\alpha\beta\gamma 1$	86
<b>5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E INMUNOLÓGICA DEL FRAGMENTO <math>t\alpha\beta\gamma 1</math> PURIFICADO</b>	<b>87</b>
5.1. Estudios de desnaturalización térmica y dicroísmo circular	87
5.2. Análisis SEC-MALLs	88
5.3. Estudios Inmunológicos	89
<b>6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FRAGMENTO <math>t\alpha\beta\gamma 1</math> PURIFICADO</b>	<b>90</b>
6.1. Efecto sobre la adhesión celular	91
6.2. Efecto sobre la reorganización del citoesqueleto de actina	93
6.3. Efecto sobre la morfología celular	94
6.4. Efecto sobre la proliferación celular	95

<b>7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS CULTIVADAS SOBRE EL FRAGMENTO <math>\alpha\beta\gamma 1</math> PURIFICADO</b>	<b>96</b>
7.1. <i>Microarrays</i> de ADN	96
7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	101
7.3. Zimografía	102
7.4. Estudios de migración e invasión celular	103
<b><u>DISCUSIÓN</u></b>	<b><u>105</u></b>
<b><u>CONCLUSIONES</u></b>	<b><u>115</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b><u>119</u></b>
<b><u>ANEXO</u></b>	<b><u>135</u></b>

## CLAVE DE ABREVIATURA





AcMo	Anticuerpo monoclonal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BMP-90	Fibulina, del inglés <i>Basement Membrane Protein</i>
BP	Proceso biológico, del inglés <i>Biological Process</i>
BSA	Seroalbúmina bovina, del inglés <i>Bovine Serum Albumine</i>
CCL1	Dominio <i>coiled-coil</i> de la laminina 111
CCL1 $\alpha$	Dominio <i>coiled-coil</i> de la cadena $\alpha$ 1
CCL1 $\beta$	Dominio <i>coiled-coil</i> de la cadena $\beta$ 1
CCL1 $\gamma$	Dominio <i>coiled-coil</i> de la cadena $\gamma$ 1
CF	Citometría de flujo
DC	Dicroísmo circular
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida, del inglés <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico, del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada, del inglés <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EHS	Sarcoma murino de <i>Englebreth-Holm-Swarm</i>
FDR	Estadístico que refleja la proporción esperada de falsos positivos, del inglés <i>False Discovery Rate</i>
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico, del inglés <i>Fibroblastic Growth Factor</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GAG	Glicosaminglicanos
GO	Ontología génica, del inglés <i>Gene Ontology</i>
GPNMB	Glicoproteína NMB
HA	Glicoproteína vírica derivada del virus <i>Influenza</i> , del inglés <i>Hemagglutinin</i>
HRP	Peroxidasa de rábano, del inglés <i>Horseradish Peroxidase</i>
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleukina
IMAC	Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados, del inglés <i>Ion Metal Affinity Chromatography</i>
LAR	Antígeno leucocitario común, del inglés <i>Leukocyte Antigen-Related</i>
LE	Dominio EGF- <i>like</i> de la laminina, del inglés <i>Laminin EGF-like</i>
LF	Dominio globular de la cadena $\beta$ , del inglés <i>Laminin Four</i>

## CLAVES DE ABREVIATURA

LG	Dominios globulares carboxiterminales de la cadena $\alpha$ , del inglés <i>Laminin Globular</i>
LM-111	Laminina 111
LM $\alpha$ 1	Cadena $\alpha$ 1 de la laminina
LM $\beta$ 1	Cadena $\beta$ 1 de la laminina
LM $\gamma$ 1	Cadena $\gamma$ 1 de la laminina
LN	Dominio aminoterminal, del inglés <i>Laminin N-terminal</i>
MALLS	Purificación mediante dispersión de la luz, del inglés <i>MultiAngle Laser Scatering</i>
MALAT1	Del inglés, <i>Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1</i>
MB	Membrana basal
MDA-7	Del inglés, <i>Melanoma Differentiation Associated Gene-7</i>
MEC	Matriz extracelular
MF	Función molecular, del inglés <i>Molecular Function</i>
MGP	Del inglés, <i>Matrix Gla Protein</i>
MMP	Proteasas de matriz, del inglés <i>Matix MetalloProteinase</i>
NC1	Dominio no colagenoso 1, del inglés <i>Non-Collagenous</i>
OCR1	Del inglés, <i>Ovarian Cancer-Related Protein 1</i>
PE	Ficoeritrina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
qRT-PCR	PCR en tiempo real, del inglés <i>Quantitative Real Time PCR</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
scFv	Fragmento variable de cadena única, del inglés <i>Single Chain Fragment Variable</i>
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño, del inglés <i>Size Exclusion Chromatography</i>
SPARC	Del inglés <i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
t $\alpha$ 1	Cadena $\alpha$ 1 truncada de la laminina
t $\beta$ 1	Cadena $\beta$ 1 truncada de la laminina
t $\gamma$ 1	Cadena $\gamma$ 1 truncada de la laminina
t $\alpha\beta\gamma$ 1	Fragmento heterotrímero truncado de la laminina 111
VEGF	Factor de crecimiento endotelial, del inglés <i>Vascular Endotelial Growth Factor</i>

# INTRODUCCIÓN



## 1. MATRIZ EXTRACELULAR

La matriz extracelular (MEC) es un entramado tridimensional cuya organización y composición están íntimamente adaptadas a las funciones de los tejidos donde se ubica (Bruckner P, 2010). Los componentes de la MEC son producidos por las células residentes (epiteliales y estromales) y secretados al medio extracelular donde se ensamblan siguiendo un programa definido (Bruckner-Tuderman L et al, 2010). Los principales componentes de la MEC son glicosaminoglicanos (GAG), que con la excepción del ácido hialurónico se unen a un *core* proteico para dar lugar a proteoglicanos como el versicano y el perlecano (Sarrazin S et al, 2011), y glicoproteínas, dentro de las cuales se distinguen dos grandes grupos: por un lado los colágenos y por otro proteínas no colágenas como la laminina, la fibronectina y la tenascina (Rozario T et al, 2010).

Mediante técnicas de microscopía electrónica y difracción de rayos X se ha podido visualizar una organización jerárquica de la MEC que va desde las macromoléculas individuales (fundamentalmente glicoproteínas y carbohidratos), pasando por agregados supramacromoleculares en forma de fibrillas, microfibrillas, filamentos o entramados que se ensamblan a su vez en estructuras a modo de fibras, membranas basales (MB) o matrices intersticiales (Bruckner P, 2010; Bruckner-Tuderman L et al, 2010).

En vertebrados existen cientos de genes que codifican para proteínas de MEC. Muchos de ellos, como los componentes básicos de las MB, se encuentran en la mayoría de los metazoos (Whittaker CA et al, 2006). Las proteínas de MEC son en general grandes y complejas, con múltiples dominios, y están altamente conservadas entre diferentes taxones (Hynes RO, 2009). Tradicionalmente, a la MEC se le había asignado un papel pasivo meramente estructural dentro de la organización tisular. Sin embargo, algunos motivos de estos dominios son reconocidos por receptores que median adhesión celular y ponen en marcha la transducción de señales (DuFort CC et al, 2011). Es más, características puramente mecánicas de la MEC como rigidez y deformabilidad también condicionan el comportamiento celular (Cukierman E et al, 2010; Gritsenko PG et al, 2012). En conclusión, la MEC desempeña un papel fundamental en procesos celulares clave: diferenciación, polarización, proliferación, supervivencia, y migración (Geiger B et al, 2011).

Además la MEC constituye un reservorio de factores solubles; de hecho, varios de sus componentes tienen lugares de unión tanto para receptores de membrana como para factores de crecimiento, favoreciendo su interacción con los receptores específicos (Vaday GG et al, 2000; Iyer AK et al, 2007; Alam N et al, 2007). Este efecto de concentración local

de determinados factores contribuye al establecimiento de gradientes que son claves en los procesos de desarrollo (Hynes RO, 2009). Estos factores de crecimiento puede ser liberados de la MEC por la acción de proteasas (Hawinkels LJ et al, 2008; Vempati P et al, 2010; Ferrara N, 2010), pero éste no es un requisito para que pueden interaccionar con sus receptores; de hecho, algunas proteínas de la MEC funcionan como cofactores (Mohammadi M et al, 2005).

## 2. MEMBRANA BASAL

### 2.1. Estructura y función

La MB es una forma altamente especializada de MEC, que adopta la forma de una lámina “*de exquisita delicadeza*”, según la descripción de 1840 (Bowman W, 1840), que subyace bajo todas las células epiteliales y endoteliales, envuelve células o unidades funcionales en nervios periféricos, tejido adiposo, músculo, páncreas y riñón, y que separa el parénquima del tejido conectivo. Las MB aparecen de forma temprana en el desarrollo embrionario, ya que sus componentes son importantes mediadores de la compartimentalización tisular, y están presentes en todos los tejidos (Martin GR et al, 1988; Kalluri R, 2003; Kruegel J et al, 2010).

La MB está formada por una gran número de moléculas, cuya composición varía dependiendo de la localización tisular, pero que a grandes rasgos está constituida por dos redes entrelazadas de laminina y colágeno IV polimerizados. Estas macromoléculas tienen hasta 400 nm de longitud, mientras que una MB típica tiene un grosor de 50 a 100 nm. Por ello, se asume que los componentes de la MB se organizan en una única capa molecular, con los ejes largos de laminina y colágeno paralelos a la superficie (Figura 1).

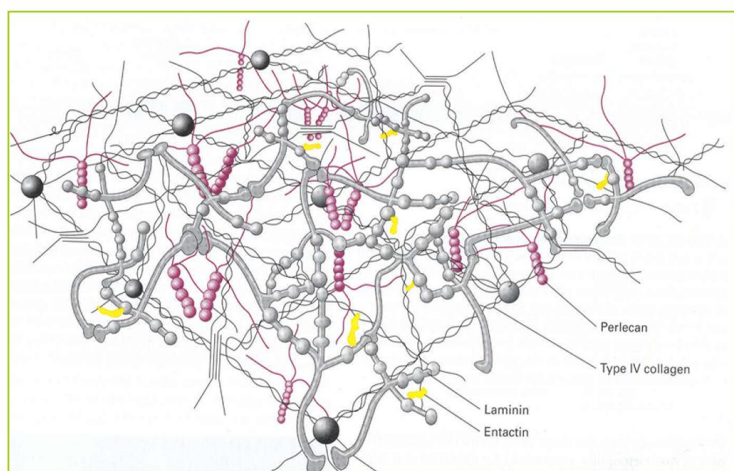


Figura 1. Modelo hipotético de la MB. Los componentes mayoritarios, lamininas y colágenos, se entrelazan mediante moléculas conectoras: entactina y perlecana.

La naturaleza de la MB hace que su aislamiento a partir de muestras tisulares sea muy complicado. Gran parte de nuestro conocimiento sobre la estructura y la función de la MB se debe al descubrimiento a finales de los años 70 del sarcoma murino de *Englebreth-Holm-Swarm* (EHS), que produce grandes cantidades de varios de sus componentes (Kleinman HK et al, 1986). Su purificación como extracto proteico ha permitido analizar sus propiedades bioquímicas y su actividad biológica, así como iniciar los estudios de la MB a nivel molecular (Rowe RG et al, 2008).

## 2.2. Componentes

Las MB están constituidas por diferentes proteínas en función del tejido donde se localizan. A medida que se han ido identificando nuevos componentes e isoformas, su complejidad y su diversidad se ha incrementado de forma exponencial. De las más de 50 proteínas identificadas, a continuación se describen las más relevantes. De forma genérica, podemos considerar que todas las MB contienen una isoforma de laminina, uno o dos tipos de nidógeno/entactina, perlecano y una o más variantes del colágeno IV.

**2.2.1. Colágenos.** Las grandes proteínas glicosiladas de la MB contienen repeticiones en tándem de diferentes dominios, que probablemente tienen su origen en duplicaciones génicas. Los colágenos se caracterizan por poseer una secuencia de aminoácidos repetida Gly-X-Y, donde los motivos X e Y suelen ser lisinas y prolinas hidroxiladas, y que estructuralmente se traduce en una triple hélice (Conway JF et al, 1991). Se conocen al menos 28 genes que codifican para distintas cadenas  $\alpha$  que se asocian formando homo o heterotrímeros, divididos en dos grandes grupos: colágenos fibrilares (colágenos I, II, III) y colágenos no fibrilares (colágenos IV, XV, XVIII), caracterizados por la presencia en su extremo carboxilo terminal de dominios globulares NC1 (del inglés, *non-collagenous*) (Kalluri R, 2003; LeBleu VS et al, 2007). Aunque el colágeno tipo I es el más abundante en mamíferos, el colágeno tipo IV es el fundamental en la composición de las MB (Kalluri R, 2003). Los colágenos XV y XVIII, por su parte, se localizan en zonas limítrofes entre la MB y el estroma, donde ejercen funciones de anclaje.

**2.2.1.1. Colágeno IV.** En mamíferos se han identificado 6 genes que codifican para las cadenas  $\alpha$  del colágeno IV ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ), que pueden ensamblarse

dando lugar a diferentes heterotrímeros: (Yurchenco PD, 2011). El “esqueleto” de colágeno IV es el que proporciona en gran medida estabilidad mecánica a las MB. Además, muchos tipos celulares se unen al colágeno IV a través de receptores específicos, tanto integrinas ( $\alpha1\beta1$ ,  $\alpha2\beta1$ ,  $\alpha3\beta1$ ) como no integrinas (CD44 y DDR-1) (Heino J et al, 2009). La degradación proteolítica de colágeno IV genera nuevos sitios de unión que pueden modular su actividad biológica. De hecho, el fragmento proteolítico derivado del extremo carboxilo terminal de la cadena  $\alpha3$ , denominado tumstatina, ejerce efecto anti-angiogénico (Maeshima Y et al, 2000). Las mutaciones en las cadenas de colágeno IV se han asociado con síndromes como el de Alport (que afecta a las cadenas  $\alpha3$ ,  $\alpha4$  y  $\alpha5$ ) (Kleppel MM et al, 1987; Miner JH, 2003); mientras que autoanticuerpos frente a la cadena  $\alpha3$  originan el síndrome de Goodpasture (Wieslander J et al, 1984).

**2.2.1.2. Colágeno XV.** Se encuentra en diferentes MB, incluida la vascular, aunque predomina en MB asociadas a miocardio y músculo esquelético. Es un homotrímero ampliamente glicosilado formado por tres cadenas  $\alpha1$  con una región central interrumpida por varios dominios NC. Presenta gran homología estructural con el colágeno XVIII, y el extremo carboxilo terminal de su dominio NC1 (restina) también tiene actividad anti-angiogénica (Kalluri R, 2003).

**2.2.1.3. Colágeno XVIII.** Aparece en MB de tipo epitelial y vascular. Se han identificado tres variantes que difieren en sus regiones amino terminales. El procesamiento proteolítico del extremo carboxilo terminal del dominio NC1 libera un fragmento denominado endostatina, posiblemente el inhibidor endógeno de angiogénesis mejor caracterizado (O'Reilly MS et al, 1997; Boehm T et al, 1997). Mutaciones en el gen COL18A1 son el origen del síndrome de Knobloch, caracterizado por la presencia de anomalías vasculares en la retina. (Kalluri R, 2003).

**2.2.2. Lamininas.** Las lamininas (LM) constituyen junto con los colágenos los componentes mayoritarios de la MB (Yurchenco PD et al, 1992) (Figura 2).



Pertenecen a una familia de glicoproteínas heterotriméricas de gran tamaño, cuya expresión varía según el tejido o tipo celular y el estadio del desarrollo. (Beck K et al, 1990; Aumailley M et al, 2005). Más información sobre su estructura y funciones, en el apartado 3.

**2.2.3. Nidógenos/Entactinas.** Los nidógenos 1 y 2 (entactina 1 y 2) constituyen el 2-3 % de las proteínas de la MB. Son glicoproteínas de aproximadamente 150 kDa constituidas por tres dominios globulares (G1, G2, G3). Los dominios G1 y G2 se encuentran en el extremo amino terminal muy próximos entre sí, y separados del dominio G3 situado en el extremo carboxilo terminal por una región central rica en dominios *EGF-like* (Figura 2). El dominio G3 se une con gran afinidad al brazo corto de la cadena  $\gamma 1$  de la LM. El dominio G2 se une al colágeno IV, así como a perlecana y fibulinas (LeBleu VS et al, 2007; Kruegel J et al, 2010). Su capacidad de unión a LM y colágeno IV convierte a los nidógenos en proteínas clave como conectores moleculares en el ensamblaje de la MB. Ambas isoformas están ampliamente distribuidas, aunque la expresión de nidogeno 2 presenta un patrón más restringido a MB vasculares (LeBleu VS et al, 2007). Los ratones doble *knockout* para nidógeno 1 y 2 presentan muerte perinatal debido a anomalías cardiopulmonares severas (LeBleu VS et al, 2007; Hamill KJ et al, 2009; Kruegel J et al, 2010).

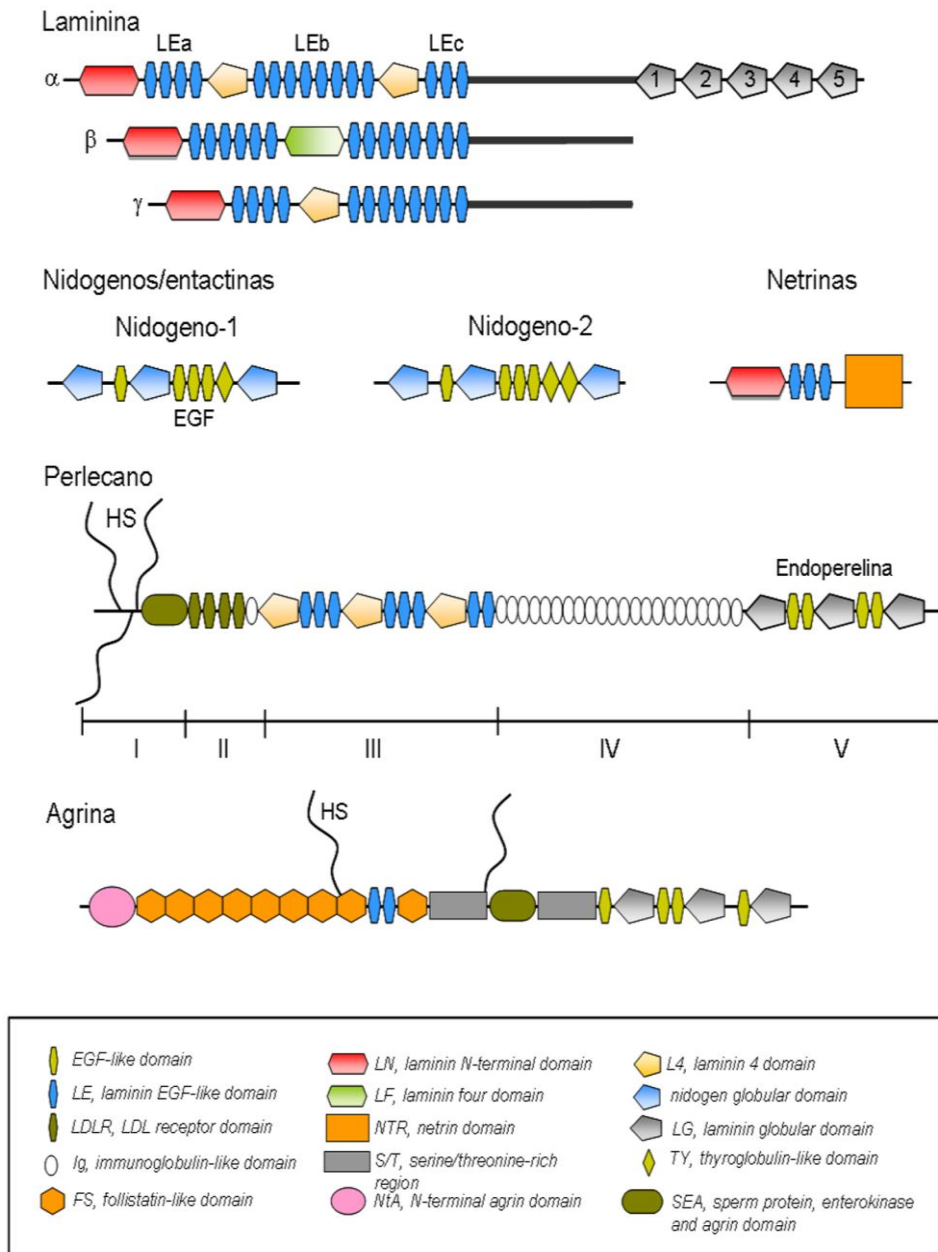


Figura 2. Representación esquemática de los principales componentes no colágenos de la MB y sus dominios.

**2.2.4. Perlecano.** Es un proteoglicano heparán sulfato de unos 400-450 kDa, formado por 5 regiones compuestas a su vez por uno o más dominios estructurales (Figura 2). La región IV, con repeticiones de dominios tipo inmunoglobulina (Ig) y la región V se unen a gran variedad de componentes de la MB, incluyendo nidógeno 1 (dominio IV), la integrina  $\alpha 2\beta 1$  y  $\alpha$ -dystroglicano (dominio V). Las cadenas heparán sulfato, localizadas fundamentalmente en el extremo amino terminal, tienen además capacidad de unión a LM y a colágeno IV (LeBleu VS et al, 2007; Kruegel J et al, 2010).

También puede interactuar con LM a través de su unión con nidógeno, formando un complejo ternario. Aunque no resulta esencial para el ensamblaje de la MEC durante el desarrollo embrionario, su expresión es clave para el mantenimiento de la integridad de la MB, especialmente en tejidos sometidos a estrés mecánico, como el miocardio.

**2.2.5. Agrina.** Es otro proteoglicano heparán sulfato de la MB (>400 kDa), con un papel fundamental en la formación de uniones neuromusculares (Hamill KJ et al, 2009). Existen varias isoformas producidas por *splicing* alternativo, la más abundante tiene un extremo amino terminal más largo que contiene un dominio de unión a la región heterotrimérica con estructura *coiled-coil* de la LM, en concreto a la cadena  $\gamma 1$  (Kammerer RA et al, 1995). De hecho, esta fue la primera descripción de una interacción con la región *coiled-coil* de la LM (Kammerer RA et al, 1999). Todas las agrinas contienen dominios LG carboxilo terminales que unen  $\alpha$ -dístroglicano e integrinas.

**2.2.6. Fibulinas.** Los siete miembros de la familia, también denominada BM-90 (del inglés, *Basement Membrane Protein 90*) presentan dos módulos estructurales, uno mayoritario con repeticiones *EGF-like* en tándem y otro característico de esta familia en el extremo carboxilo terminal. Su incorporación a la MB está mediada por su fuerte interacción con LM y nidógenos. Las fibulinas 1 y 2 se unen a los dominios G2 y G3 del nidógeno 1 y a diferentes cadenas de LM, y la fibulina 2 a los dominios IV y V del perlecano. El fenotipo del ratón *knockout* demuestra que la fibulina 1 desempeña un papel importante en la estabilización de la pared vascular durante la embriogénesis (Timpl R et al, 2003).

**2.2.7. Netrininas.** Son proteínas que comparten homología con la LM (Fahey B et al, 2012). Se identificaron originalmente por su papel en la migración axonal, aunque también regulan las funciones de las moléculas de LM con las que interactúan (Forcet C et al, 2002). En concreto, la netrina 4 se une a los brazos cortos de las cadenas  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$  y promueve su polimerización (Yurchenco PD, 2011).

### 3. LAMININA

#### 3.1. Estructura y función

La LM se identificó hace más de 30 años a partir de extractos proteicos obtenidos del sarcoma murino EHS (Timpl R et al, 1979). La LM pertenecen a una familia de glicoproteínas multidominio heterotriméricas, formada por una cadena  $\alpha$ , una cadena  $\beta$  y una cadena  $\gamma$ . La molécula posee una estructura cruciforme característica, con un brazo largo y dos o tres brazos cortos (Figura 3) (Kleinman HK et al, 1985; Beck K et al, 1990; Sarras MP, Jr. et al, 1994; Patarroyo M et al, 2002; Aumailley M et al, 2005; Kruegel J et al, 2010; Durbeej M, 2010). Los brazos cortos son los que presentan una mayor variabilidad, en longitud y número de dominios (Cognato H et al, 2000), e incluyen repeticiones de dominios de tipo LM *EGF-like* (LE) (Figura 2). Las repeticiones de módulos LE se encuentran interrumpidas en la cadenas  $\alpha$  por dos pequeños dominios globulares (L4a y L4b) y por un único dominio globular L4 en la cadena  $\gamma$ . En la cadena  $\beta$  el dominio globular se denomina LF (del inglés, *laminin four*) debido a sus diferencias con los dominios L4. Los dominios globulares más próximos a los extremos amino terminales de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se denominan LN (del inglés, *laminin N-terminal*) (Aumailley M et al, 2005; Hamill KJ et al, 2009). A continuación de las repeticiones de módulos LE, las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  incluyen largos segmentos con estructura  $\alpha$  hélice, que se unen covalentemente originando una estructura *coiled-coil* heterotrimérica (Figura 3) (Aumailley M et al, 2005; Hamill KJ et al, 2009). En la cadena  $\beta$  este segmento presenta una pequeña interrupción de 40 aminoácidos denominado dominio L $\beta$  (del inglés, *laminin beta-knob*) (Beck K et al, 1990). En el extremo carboxilo terminal la cadena  $\alpha$  presenta 5 dominios globulares LG (del inglés, *laminin globular*) (Figura 3). El segmento no globular entre los dominios LG3 y LG4 (segmento bisagra o *hinge*) permite que los dominios LG4 y LG5 adopten conformaciones múltiples y que puedan ser proteolizadas, modificando la funcionalidad del heterotrímero (Timpl R et al, 2000; Hamill KJ et al, 2009).

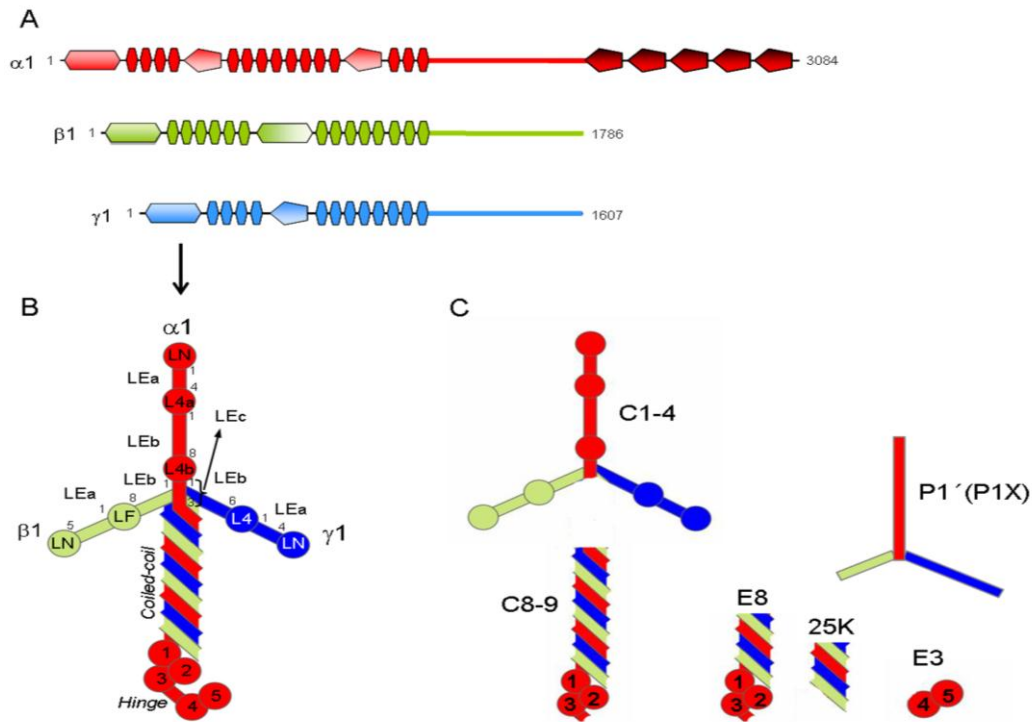


Figura 3. (A) Representación esquemática de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de la LM. (B) Estructura cruciforme característica, donde se indican los diferentes dominios según la nomenclatura simplificada propuesta por Aumailley M et al, 2005. (C) Representación de los principales fragmentos proteolíticos derivados de la LM.

En vertebrados se han identificado 5 cadenas  $\alpha$ , 3 cadenas  $\beta$  y 3 cadenas  $\gamma$  (Hallmann R et al, 2005; Tzu J et al, 2008; Kruegel J et al, 2010; Yurchenco PD, 2011) que junto con las variantes generadas por *splicing* alternativo se pueden combinar entre sí originando múltiples isoformas (Figura 4). No obstante el número de combinaciones teórico excede al de LM identificadas (Aumailley M et al, 2005; Tzu J et al, 2008; Durbeej M, 2010; Yurchenco PD, 2011). De todas las isoformas posibles solo se han identificado 16 (Durbeej M, 2010), debido a restricciones en el ensamblaje. Un ejemplo de este tipo de restricciones ocurre entre la cadena  $\gamma$ 2 y la cadena  $\beta$ 1, que nunca se encuentran asociadas (Colognato H et al, 2000; Hallmann R et al, 2005; Durbeej M, 2010). Estas isoformas presentan una distribución específica de tejido y una expresión diferencial, mayoritariamente determinada por variaciones en la expresión de las cadenas  $\alpha$  (Patarroyo M et al, 2002; Hallmann R et al, 2005; Durbeej M, 2010). Recientemente se ha diseñado una nueva nomenclatura basada en las subunidades que componen cada heterotr trímero (Aumailley M et al, 2005) (Tabla I) (Figura 4).

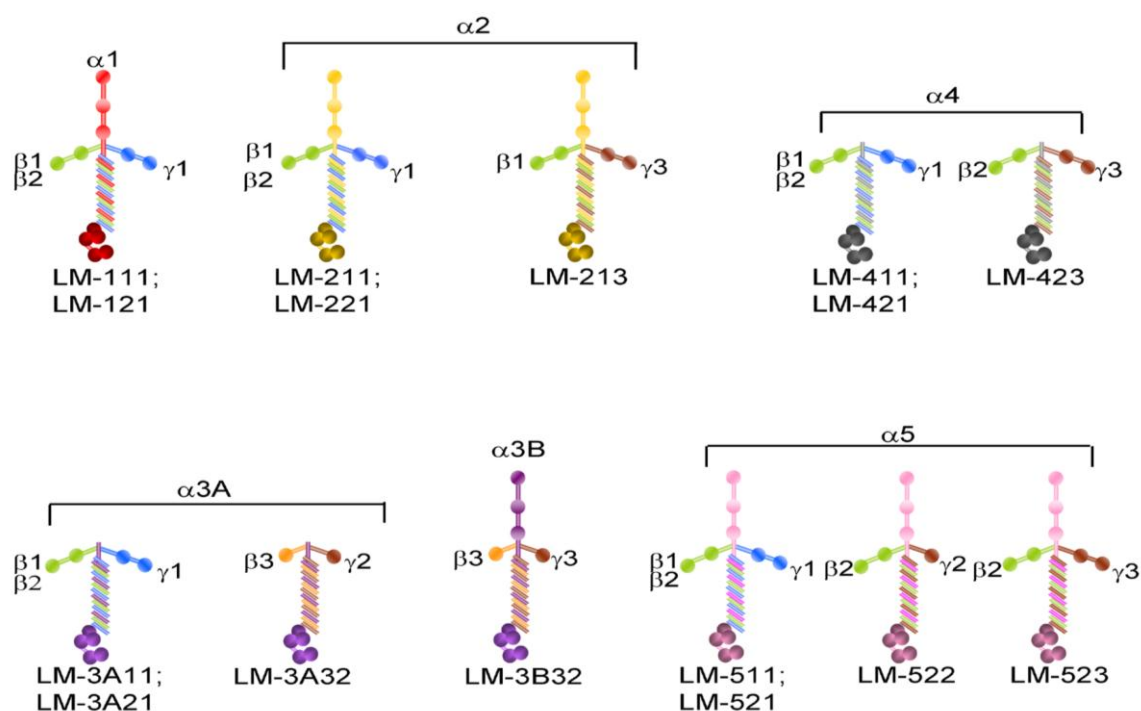


Figura 4. Agrupación de las 16 isoformas de LM identificadas, en función de las cadenas  $\alpha$ . Las letras A y B hacen referencia a variantes según modificaciones proteolíticas. Figura modificada de Aumailley M et al, 2005

Muchas isoformas de LM sufren modificaciones postraduccionales, como la proteólisis de sus dominios LG y de sus brazos cortos, que alteran tanto la capacidad ensambladora como su actividad biológica (Ghosh S et al, 2000). Mediante ensayos de proteólisis controlada se ha determinado la relación estructura/función de la LM (Figura 3). No obstante, esta aproximación experimental puede alterar sitios de interacción con receptores u otros componentes de la MB y/o exponer epítomos crípticos con funciones biológicas diferentes a las de la LM nativa no proteolizada (Ghosh S et al, 2000). Se han identificado numerosos receptores de superficie celular que interaccionan con LM, entre los que destacan las integrinas,  $\alpha$ -distroglicanos, y sindecanos.

Tabla I. Distribución y nomenclatura de las isoformas de LM identificadas.

<i>Nombre clásico</i>	<i>Nombre actual</i>	<i>Composición</i>	<i>Principal localización</i>
laminina 1 (clásica)	LM-111	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	epitelio embrionario en adultos: riñón, hígado, órganos reproductores; endotelio del cerebro
laminina 2 (merosin)	LM-211	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	nervios periféricos, tejidos miogénicos (corazón, músculo)
laminina 3 (s-laminin)	LM-121	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	placenta
laminina 4 (s-merosin)	LM-221	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	uniones neuromusculares, MBG
laminina 5 ó 5a (kaleina/niceina)	LM-332 ó 3A32	$\alpha 3A\beta 3\gamma 2$	epidermis (formación hemidesmosomas), placenta, glándula mamaria
laminina 5b	LM-3B32	$\alpha 3B\beta 3\gamma 2$	epidermis, útero, pulmón
laminina 6 ó 6a (k-laminina)	LM-311 ó 3A11	$\alpha 3A\beta 1\gamma 1$	epidermis, amnios
laminina 7 ó 7a	LM-321 ó 3A21	$\alpha 3A\beta 2\gamma 1$	epidermis, amnios
laminina 8	LM-411	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	endotelio, músculo liso, tejido adiposo, nervios periféricos
laminina 9	LM-421	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	endotelio, unión neuromuscular, MBG <sup>2</sup> , músculo liso
laminina 10	LM-511	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	epitelio y endotelio adulto, músculo liso
laminina 11	LM-521	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	epitelio y endotelio adulto, músculo liso, MBG <sup>2</sup>
laminina 12	LM-213	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	epitelio ciliado, testículos.
laminina 14	LM-423	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	retina, SNC <sup>1</sup>
-	LM-522	$\alpha 5\beta 2\gamma 2$	médula ósea
laminina 15	LM-523	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	retina, SNC <sup>1</sup>

1 Sistema Nervioso Central

2 Membrana Basal Glomerular

## INTRODUCCIÓN

Las integrinas son los receptores de superficie celular mejor caracterizados, son heterodímeros transmembrana implicados en numerosas funciones biológicas (Yurchenco PD, 2011), que regulan la movilidad, proliferación, polaridad, diferenciación y supervivencia celular. Aunque la mayoría de las integrinas se unen al dominio LG (subdominios LG1, LG2 y LG3), algunas interaccionan con el dominio LN de la cadena  $\alpha$  y con el extremo carboxilo terminal de las cadenas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$  (Durbeej M, 2010) (Ponce ML et al, 1999). El distroglicano es un receptor celular que organiza la unión entre la LM y la distrofina. El  $\beta$ -distroglicano es la proteína transmembrana que se une a  $\alpha$ -distroglicano y lo ancla al citoesqueleto de actina. Los sindecanos son proteoglicanos transmembrana que tienen la capacidad de unir factores de crecimiento, e interaccionar con la LM (preferentemente al subdominio LG4) a través de su cadena heparan sulfato (Colognato H et al, 2000). Están implicados en adhesión, migración y cicatrización. Las glicoproteínas sanguíneas del sistema *Lutheran* pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas e interaccionan específicamente con las isoformas de LM que contienen la cadena  $\alpha 5$ . La proteína relacionada con el antígeno leucocitario común (LAR, del inglés *leukocyte antigen-related*), es una tirosina fosfatasa que reconoce el complejo LM/nidogeno y modula su efecto biológico (O'Grady P et al, 1998). Está implicada en la orientación axonal y en el desarrollo de la glándula mamaria (Colognato H et al, 2000; Kizuka Y et al, 2008).

Es importante señalar que ciertas moléculas como la heparina o sulfatos de heparina, presentes tanto en las MB como en la superficie celular, también se unen a la LM, en regiones próximas a los sitios de interacción con integrinas (Figura 5) (Colognato H et al, 2000). Estas uniones pueden estar implicadas en el ensamblaje de la molécula, en la unión con otras moléculas de la MEC y con componentes del citoesqueleto celular, así como en la transducción de señales (Colognato H et al, 2000; Jones JC et al, 2000; Patarroyo M et al, 2002; Davis GE et al, 2005; Suzuki N et al, 2005). Recientemente se ha demostrado que para algunas isoformas, como LM-10/11 (LM-511/LM-521), LM-8 (LM-411) y LM-5 (LM-3A32), la transducción de señales ocurre a través de la activación de GTPasas de la familia Rho y Rac que controlan la organización de citoesqueleto de actina (formación de fibras de estrés, lamelipodios, filopodios) favoreciendo la respuesta migratoria (Suzuki N et al, 2005; Hamill KJ et al, 2009; Stipp CS, 2010).

Debido al gran impacto que ejerce la molécula de LM sobre la morfología, proliferación, diferenciación, polaridad, motilidad y supervivencia celular (Colognato H et al, 2000; Jones JC et al, 2000; Patarroyo M et al, 2002; Davis GE et al, 2005) se han desarrollado diferentes estrategias para la identificación de regiones implicadas en la



interacción con receptores celulares (Nomizu M et al, 1995; Colognato H et al, 2000; Ghosh S et al, 2000; Suzuki N et al, 2005).

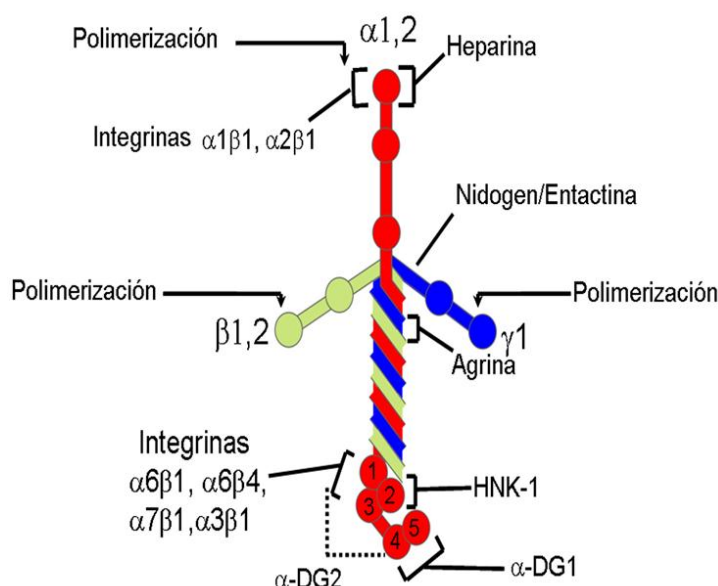


Figura 5. Representación de los sitios de unión en la LM-111 y LM-121. La interacción con integrinas ocurre en las regiones proximales del dominio globular (LG1 y/o LG2). La interacción con la agrina ocurre en fragmento *coiled-coil*. En la LM-111 el distroglicano se une en la región carboxilo terminal, mientras que la LM-211 presenta también un sitio de unión situado entre LG1-3.

El problema radica en que la mayoría de las funciones de la LM son dependientes de conformación y prácticamente todos los estudios se han realizado con péptidos sintéticos. Además, esta aproximación no ha considerado la existencia de secuencias relevantes, no accesibles inicialmente, que podrían quedar expuestas únicamente durante los procesos de desintegración de la MB, asociados con la remodelación tisular fisiológica o patológica (Colognato H et al, 2000; Patarroyo M et al, 2002).

### 3.2. Ensamblaje de la membrana basal

Diferentes estudios demuestran que las moléculas de LM son las responsables del ensamblaje de la MB (Yurchenco PD et al, 2009). De hecho, los ratones *knockout* para las cadenas  $\beta 1$  o  $\gamma 1$  carecen de MB, lo que origina una mortalidad embrionaria precoz. Por el contrario, los ratones *knockout* para el colágeno IV, nidógenos, perlecano o agrinas no presentan defectos en la MB hasta fases mucho más tardías del desarrollo (Poschl E et al, 2004). Las isoformas de LM que contienen cadenas con brazos cortos no truncados ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3B$  y  $\alpha 5$ ) son capaces de autoensamblarse formando un polímero en un proceso reversible, que consta de dos fases, una de nucleación no dependiente de calcio y otra de amplificación calcio-dependiente. El polímero así formado es un gel cuya consistencia depende de la concentración de LM y de la presencia de otros componentes. Según el

## INTRODUCCIÓN

modelo más aceptado, se produce una interacción entre los dominios LN situados en los extremos amino terminales de los brazos cortos de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  de tres moléculas de LM adyacentes (Yurchenco PD et al, 1993; McKee KK et al, 2007). Por este motivo las LM que contiene cadenas truncadas ( $\alpha 3A$  y  $\alpha 4$ ) no son capaces de polimerizar entre sí (Cheng YS et al, 1997; Gagnoux-Palacios L et al, 2001).

El proceso de ensamblaje de la MB ocurre en estrecha asociación con la superficie celular (Figura 6), lo que permite aumentar la concentración local de los componentes implicados. La identidad de las moléculas de superficie que inician el proceso de polimerización es controvertida, ya que las células expresan múltiples ligandos potenciales para LM y otros componentes de la MB. En cualquier caso, el depósito inicial de LM parece depender de interacciones a través de los dominios LG. Los dominios LG contienen lugares de unión a integrinas,  $\alpha$ -dístroglicanos, glicolípidos sulfatados y heparán sulfato. Integrinas como  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha 7\beta 1$  se unen fundamentalmente a los subdominios LG1, LG2 y LG3, con la participación de la región heterotrimérica adyacente con estructura *coiled-coil*. Por su parte, los receptores tipo dístroglicano se unen a los subdominios LG4 y LG5. Hasta la fecha, los estudios realizados con ratones *knockout* no han conseguido identificar a un único receptor responsable del ensamblaje de la MB, que ocurre en ausencia de cadenas  $\beta 1$  y  $\beta 4$  de integrinas,  $\alpha$ -dístroglicano y heparán sulfato. Parece probable que la redundancia funcional y/o compensación de varios de estos receptores enmascare su contribución individual en los estudios genéticos, así como que diferentes tipos celulares utilicen diferentes receptores. De esta forma, el tipo de cadenas de LM que se deposita en una MB concreta puede estar determinado por la afinidad de la interacción con receptores de membrana que se expresan localmente. En cualquier caso, el anclaje a la superficie celular permite también la acumulación de colágeno IV, nidógeno, perlecano y agrina en torno al entramado inicial de LM. Aunque estos componentes se pueden unir directamente a receptores celulares, no se observa su acumulación en ausencia de LM.

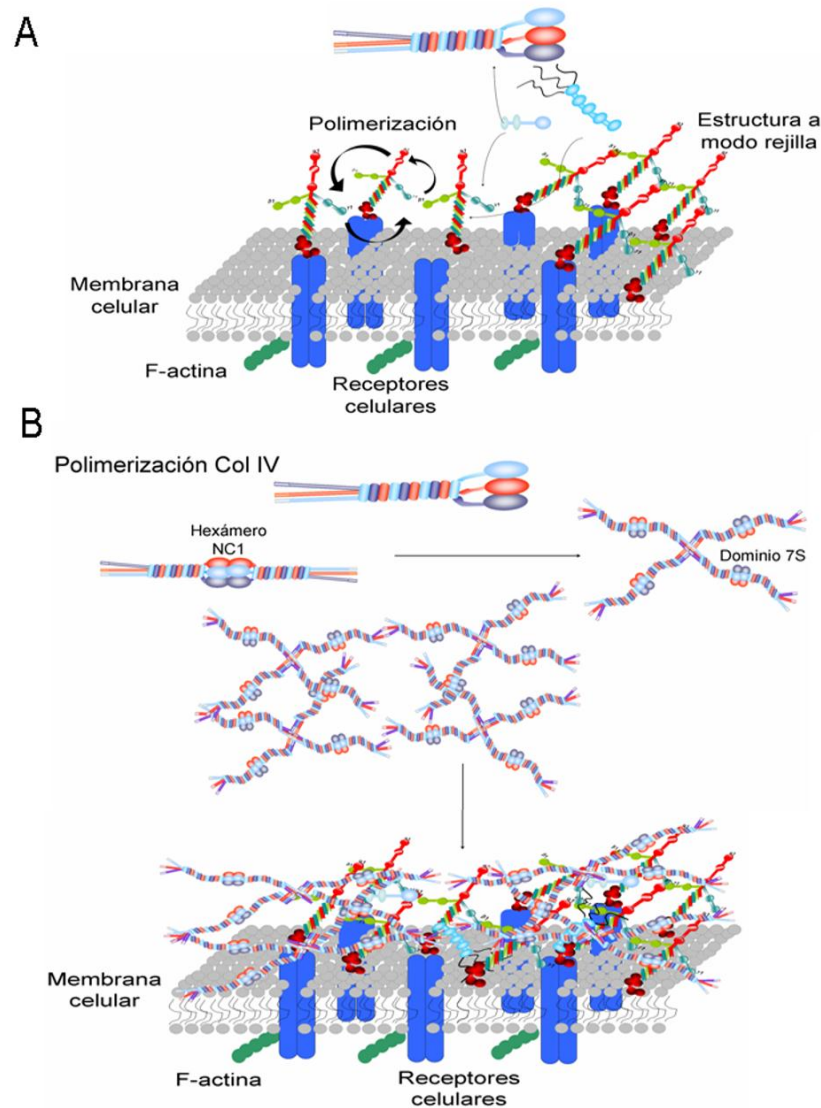


Figura 6. Modelo de ensamblaje de MB. (A) Polimerización y ensamblaje de LM a través de sus brazos cortos. La polimerización preferencial sobre la superficie celular está mediada por los dominios LG que se une a receptores celulares. Interacción de la matriz de LM sobre la superficie celular con otros componentes secretados. Los nidógenos y los perlecanos interaccionan también con el colágeno IV, actuando como estabilizadores de la interacción entre ambas moléculas. (B) Polimerización del colágeno IV sobre la superficie celular.

Una vez que se ha producido la polimerización de LM, los nidógenos se unen de forma no covalente a la LM y al colágeno IV, formando un puente que estabiliza el entramado. Las triples hélices de colágeno IV, a su vez, se autoensamblan a través de sus dominios amino terminales 7S (que oligomerizan formando tetrámeros) y carboxilo terminales NC1 (que da lugar a dímeros), constituyendo el segundo entramado proteico que junto con el de LM constituye el armazón estructural de la MB. La agrina y el perlecano se unen a la región

*coiled-coil* de la LM y al nidógeno, respectivamente, así como a distroglicano, integrinas, y glicolípidos sulfatados, estableciendo anclajes colaterales a receptores adicionales. Como consecuencia de todas estas uniones intermoleculares se produce el conglomerado supramolecular que conocemos como BM (Figura 6).

### 3.3. Implicaciones fisiopatológicas

Como se ha indicado previamente las isoformas de LM muestran un patrón de distribución específica de tejido, siendo esenciales para el correcto desarrollo tisular, y también para establecer las bases moleculares de numerosas patologías (Colognato H et al, 2000; Suzuki N et al, 2005; Scheele S et al, 2007). Para caracterizar con precisión estas funciones se han generado múltiples ratones *knockout* para diferentes cadenas de LM (Colognato H et al, 2000; Tzu J et al, 2008).

**3.3.1. Desarrollo embrionario.** Estudios realizado *in vitro* en modelos de peri-implantación con células madre embrionarias, que en suspensión forman cuerpos esféricos denominados cuerpos embrionarios, capaces de diferenciarse en endodermo y ectodermo (epiblastos) separados por una MB y una cavidad central similar a la cavidad proamniótica (Li S et al, 2003), demuestran que la ausencia de la subunidad  $\alpha$  o  $\beta$  de LM impide el ensamblaje de la MB y la polarización de los epiblastos. Por el contrario, la ausencia de  $\beta$ 1-integrina,  $\alpha$ -DG o heparan sulfatos no afecta a la diferenciación temprana de los epiblastos (Miner JH et al, 2004). Estos estudios demuestran que tanto la LM-111 como la LM-511 son claves durante el desarrollo embrionario (Durbecq M, 2010). La LM-111 es esencial en los estadios tempranos del desarrollo, ya que mutaciones en las cadenas  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1 o  $\gamma$ 1 impiden la formación de la MB embrionaria (membrana de Reichert), barrera esencial entre la sangre materna y el embrión, así como la diferenciación del endodermo, con la consiguiente inviabilidad del embrión (Miner JH et al, 2004; Suzuki N et al, 2005; Scheele S et al, 2007). No obstante, la ausencia de la cadena  $\alpha$ 1 puede ser compensada parcialmente por la cadena  $\alpha$ 5 (LM-511), permitiendo el inicio de la gastrulación. Ratones deficientes en las cadenas  $\alpha$ 3,  $\beta$ 3, and  $\gamma$ 2 experimentan muerte perinatal, mientras que los defectos en las cadenas  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4 y  $\beta$ 2 no son aparentes hasta

después del nacimiento. El único ratón *knockout* sin un fenotipo definido es el de la cadena  $\gamma 3$  (Scheele S et al, 2007).

**3.3.2. Organogénesis.** En aquellas deficiencias de cadenas de LM en las que el ratón sobrevive se ha observado el desarrollo enfermedades muy severas con afectación multiorgánica (Scheele S et al, 2007; Kruegel J et al, 2010). La enorme complejidad de estos procesos imposibilita en muchos casos el establecimiento de relaciones directas entre la ausencia o mutación de una cadena determinada de LM y el fenotipo. A continuación se indican aquellos sistemas mejor caracterizados:

**3.3.2.1. Sistema urinario.** El papel de la LM en el desarrollo embrionario del riñón fue sugerido hace más de 30 años (Ekblom P et al, 1980) La formación del riñón comienza con la invasión por el uréter del mesénquima metanéfrico, que posteriormente se condensa convirtiéndose en un epitelio polarizado rodeado por la MB glomerular (MBG). En el proceso de polarización, la cadena  $\alpha 1$  resulta imprescindible, así como el sitio de unión a nidógeno de la cadena  $\gamma 1$ . Por otro lado, un 20% de los embriones deficientes en cadena  $\alpha 5$  presentan agenesia renal uni- o bilateral (Miner JH et al, 2000). Durante el desarrollo se produce una transición en la deposición de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de LM, de manera que la MBG adulta está formada por LM-521. El bloqueo de esta transición origina la ruptura de la MBG y un fallo en la vascularización glomerular.

**3.3.2.2. Sistema neuromuscular.** En las MB de este sistema se expresan numerosas cadenas ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$ ), no obstante la subunidad más ubicua es la  $\alpha 2$  (Scheele S et al, 2007). Mutaciones en esta cadena producen defectos neuromusculares tanto en humanos como en ratones (Carmignac V et al, 2012). Los pacientes con deficiencias en la cadena  $\alpha 2$  desarrollan una distrofia muscular severa, denominada distrofia muscular congénita tipo I (Colognato H et al, 2000; Miner JH et al, 2004; Scheele S et al, 2007), que puede llegar a ser

mortal en la infancia temprana. Los ratones con mutaciones en esta cadena también sufren distrofia muscular y defectos en la mielinización tanto en el sistema nervioso periférico como central. La MB de la sinapsis contiene LM-421 y LM-521, y mutaciones en las subunidades  $\alpha 4$  o  $\beta 2$  generan uniones neuromusculares aberrantes (Miner JH et al, 2004).

**3.3.2.3. *Piel y anejos cutáneos.*** La LM-332 es fundamental en la formación de hemidesmosomas, estructuras de adhesión que unen la capa basal de la epidermis con la MB subyacente (Colognato H et al, 2000; Miner JH et al, 2004; Kruegel J et al, 2010). La ausencia de cualquiera de sus subunidades origina una patología letal denominada epidermolisis bullosa de Herlitz (Miner JH et al, 2004; Scheele S et al, 2007). La LM-511 se expresa durante el desarrollo del ectodermo, y se ha observado que embriones deficientes desarrollan sindactilia (pérdida de septación interdigital) (Miner JH et al, 2004; Kruegel J et al, 2010). Esta isoforma de LM también está implicada en el desarrollo del folículo piloso ya que induce la expresión de Shh (del inglés, *sonic hedgehog*), necesario para la proliferación y desarrollo del pelo (Miner JH et al, 2004; Tzu J et al, 2008).

**3.3.3. *Angiogénesis.*** El proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes se denomina angiogénesis y desempeña un papel fundamental en numerosos procesos biológicos durante el desarrollo embrionario y en la vida postnatal: reproducción, cicatrización e inflamación (Alvarez-Vallina L et al, 2011). Aunque los mecanismos moleculares responsables de la transición de una célula endotelial hacia un fenotipo angiogénico no son totalmente conocidos, la secuencia de eventos que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos está bien documentada (Figura 7): i) degradación de la MB vascular y de la MEC circundante por proteasas secretadas por células activadas, ii) proliferación y migración de las células endoteliales que originan nuevos brotes vasculares, y iii) formación de la luz vascular y anastomosis de los brotes vasculares para formar nuevas redes capilares.

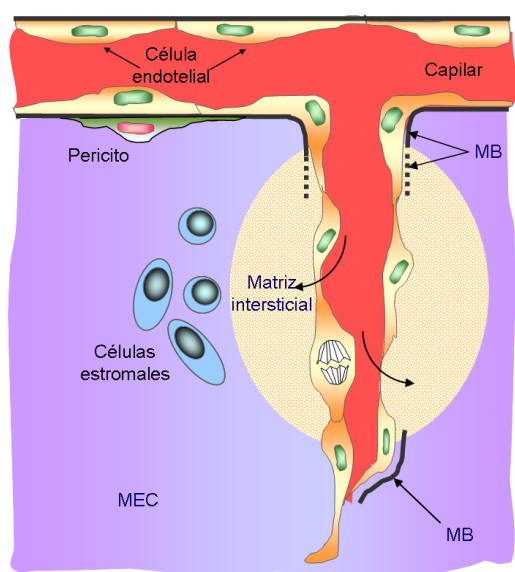


Figura 7. Representación esquemática del proceso de neoformación vascular.

El crecimiento incontrolado de los vasos sanguíneos es un trastorno subyacente en numerosas patologías, como artritis reumatoide, retinopatía diabética, y progresión de los tumores sólidos. Numerosas evidencias experimentales

indican que la expansión tumoral depende del constante aporte de nuevos vasos sanguíneos. La mayoría de los tumores persisten *in situ* en un estado quiescente avascular durante largos periodos de tiempo (Sanz L et al, 2003a). El cambio en el equilibrio local entre factores reguladores negativos y positivos, en general debido a que un subgrupo de células dentro del tumor cambia hacia un fenotipo angiogénico, hace que el tumor empiece a crecer rápidamente y llegue a ser clínicamente detectable. Entre los factores positivos destacan el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), entre otros. Entre los factores inhibidores destacan la endostatina, fragmento proteolítico derivado del colágeno XVIII, y la angiostatina derivada del plasminógeno (Sanz L et al, 2003a; Marneros AG et al, 2001).

### 3.4. Oportunidades de intervención terapéutica

En ausencia de la vascularización adecuada las células tumorales sufren un proceso de necrosis y/o apoptosis, lo cual inhibe o modera significativamente el crecimiento tumoral (Folkman J, 1972). Diferentes estudios indican que la administración sistémica de agentes anti-angiogénicos tiene actividad antitumoral (Sanz L et al, 2005; Sanz L et al, 2012). Aunque se han identificado diversos inhibidores endógenos y numerosas moléculas implicadas en el proceso de angiogénesis, su gran complejidad, tanto en el ámbito estructural como molecular, ha dificultado su estudio sistemático (Kerbel R et al, 2002). Las proteasas y los factores de crecimiento que intervienen en los estadios iniciales del proceso



## INTRODUCCIÓN

de neoformación vascular pertenecen a familias con un número creciente de miembros, que presentan un alto grado de redundancia funcional (Sanz L et al, 2003b). Se ha demostrado que la neutralización, con fines terapéuticos, de alguno de estos factores puede originar la selección de variantes tumorales clonales que producen o dependen de otro u otros factores angiogénicos (Figura 8) (Sanz L et al, 2003a). Por el contrario algunas evidencias experimentales indican que las interacciones entre célula endotelial y MB están altamente conservadas (Kubota Y et al, 1988; Simon-Assmann P et al, 2011) (Sanz L et al, 2003a). La identificación de estas regiones funcionalmente activas, implicadas en los procesos de diferenciación y reorganización vascular, y la generación de anticuerpos o agentes bloqueantes permitiría evitar los problemas de redundancia asociados con las terapias anti-angiogénicas actuales (Figura 8).

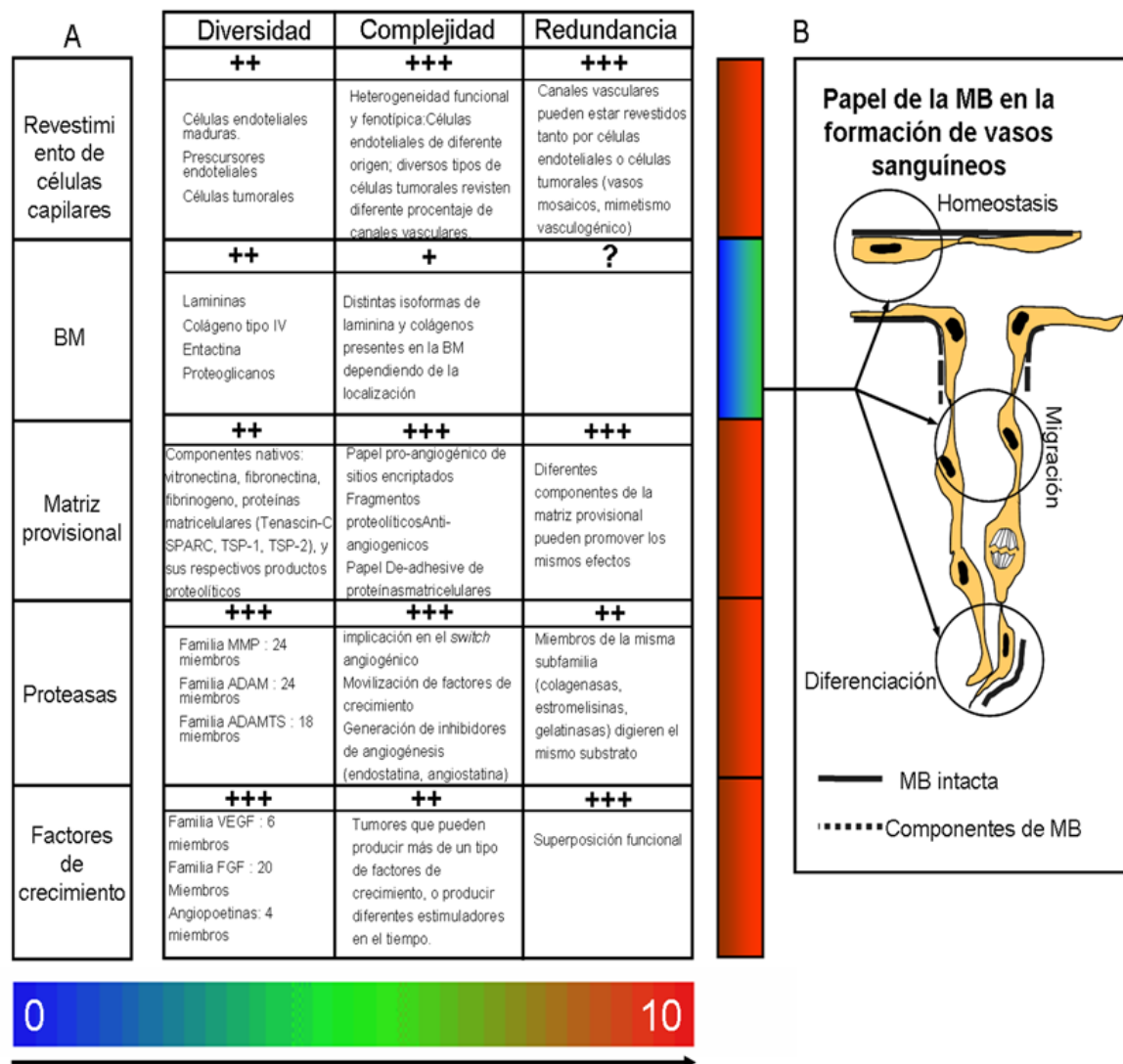


Figura 8. Representación esquemática de la heterogeneidad y redundancia asociada a cada estadio del proceso de neoformación vascular. Figura modificada de Sanz L et al, 2003a.



Nuestro grupo ha demostrado que es posible generar anticuerpos monoclonales (AcMos) frente a componentes de la MB, empleando sistemas de selección *in vitro* de repertorios de genes V humanos expresados en la superficie de un bacteriofago (Sanz L et al, 2001). Empleando como antígeno LM-111 murina en su estado nativo, se ha demostrado que la mayoría de los AcMos generados son altamente específicos y que algunos bloquean la interacción de diferentes tipos celulares con substratos proteicos ricos en LM-111. Estos resultados indican que los AcMos reconocen regiones funcionalmente activas de la LM-111 y que esta interacción tiene afinidad suficiente para competir de forma efectiva con el ligando endógeno, expresado en la superficie celular. Uno de los AcMos generados es capaz de modular/inhibir el proceso de morfogénesis capilar *in vitro* e *in vivo*. En un modelo murino este AcMo (L36) presentaba un notable efecto inhibitor del crecimiento tumoral (Sanz L et al, 2002), lo cual indica que el AcMo esta bloqueando una interacción molecular (MB/célula endotelial) de gran transcendencia fisiológica. Empleando técnicas de mapeo epitópico convencional y repertorios peptídicos hemos modelado la región reconocida por el AcMo L36 (Figura 9) (Sanz L et al, 2003c). El epitopo está localizado en la región heterotrimérica con estructura *coiled-coil* de la LM-111. Además nuestros resultados indican que esta región interacciona con un receptor tipo integrina, y que esta interacción modula el proceso de morfogénesis de la célula endotelial para formar estructuras capilares (Sanz L et al, 2002).

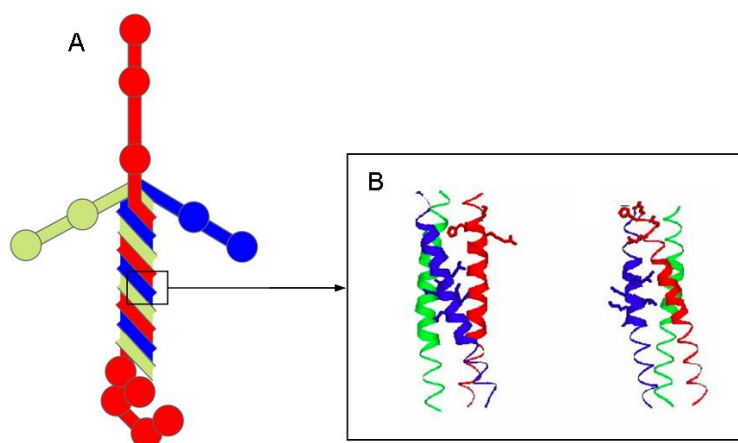


Figura 9. Localización (A) y modelado (B) de la región de la LM-111 reconocida por el anticuerpo L36. Figura modificada de Sanz L et al, 2003c.



## OBJETIVOS



Este trabajo se propone realizar una caracterización estructural y funcional del brazo largo de la LM-111, mediante la generación de un fragmento recombinante heterotrimérico con estructura *coiled-coil*, carente de dominios globulares. Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Generar en un sistema de expresión eucariota cada una de las cadenas truncadas ( $t\alpha 1$ ,  $t\beta 1$  y  $t\gamma 1$ ) que componen el heterotrimero  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ .
- II. Generar y purificar en un sistema de expresión eucariota el fragmento recombinante heterotrimérico ( $t\alpha\beta\gamma 1$ ).
- III. Caracterización estructural del  $t\alpha\beta\gamma 1$ .
- IV. Caracterización funcional del  $t\alpha\beta\gamma 1$ .



# MATERIALES Y MÉTODOS





## 1. CÉLULAS PRIMARIAS Y LÍNEAS CELULARES

En la Tabla II se indican las células (líneas celulares y células primarias) utilizadas en este trabajo y las condiciones de cultivo.

Tabla II: Líneas celulares y células primarias.

<i>Nombre</i>	<i>Proveedor-Referencia</i>	<i>Tipo celular</i>	<i>Especie</i>	<i>Medio de cultivo</i>
HEK-293	ATCC <sup>1</sup> CRL-1573	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	DMEM-C
293F	Life Technologies	Fibroblasto de riñón embrionario	Humano	FreeStyle™ 293 expression medium (Life Technologies)
HT-1080	ATCC <sup>1</sup> CCL-121	Fibrosarcoma	Humano	DMEM-C
HUVEC <sup>3</sup>	Lonza	Células endoteliales de vena umbilical	Humano	EGM-2 (Lonza)
HBVP <sup>4</sup>	ScienceCell	Pericitos de vasculatura de cerebro	Humano	Pericyte Medium (ScienceCell)

1 ATCC: *American Type Culture Collection* (EE.UU.)

2 DMEM-C (DMEM completo): Medio DMEM suplementado con un 10% (vol/vol) de suero bovino fetal (FCS), y con una mezcla de 2 mM L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin.

3 HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

4 HBVP: *Human Brain Vascular Pericytes*

Todas las células se cultivaron a 37 °C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub> excepto las células 293F que se cultivaron en agitación (250 rpm) a 37 °C, 95% de humedad y 8% de CO<sub>2</sub> y se analizaron por PCR de forma rutinaria para descartar la contaminación por micoplasmas utilizando el *kit Mycoplasma Plus TM Primer Set* (Stratagen).

## 2. CONSTRUCCIONES GÉNICAS

Para propagar y clonar los vectores se utilizaron en función del tipo de plásmido bacterias *E. coli* TOP-10 o *E. coli* Stbl3 (Life Technologies). Las bacterias transformadas con los distintos plásmidos se cultivaron a 37 °C en medio sólido TYE o en medio líquido 2xYT (ambos de Life Technologies), suplementados con 50 µg/mL de ampicilina (Life Technologies). Todas las técnicas generales de ADN recombinante se llevaron a cabo

según métodos estándar (Sambrook 2006). Las enzimas de restricción utilizadas fueron de New England Biolabs. El ADN plasmídico se purificó empleando los *kits* de aislamiento *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega) y *Qiagen Midi-Prep* (Qiagen). Los oligonucleótidos sintéticos se obtuvieron de Roche. Las construcciones se revisaron por secuenciación usando el método de los dideoxinucleótidos y un secuenciador de ADN automático ABI-PRISM (Perkin Elmer).

## 2.1. Vectores de expresión

### 2.1.1. Vectores de expresión que codifican variantes truncadas de la cadena $\alpha 1$

Los vectores generados para la expresión de variantes truncadas de la cadena  $\alpha 1$  ( $\alpha 1$ ) aparecen detallados en la Tabla III. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla IV.

Tabla III. Vectores  $\alpha 1$  y  $\alpha 1$ .

<i>Vector</i>	<i>Vector origen</i>	<i>Inserto</i>	<i>Características</i>	<i>Proveedor-Referencia</i>
pCIS-LM $\alpha 1$	pCIS	LM $\alpha 1$	(Colognato-Pyke H et al, 1995)	Dr. Yurchenco <sup>1</sup>
pCR2.1-TOPO- $\alpha 1$	pCR2.1-TOPO <sup>2</sup>	$\alpha 1$	Promotor lac Ampicilina <sup>R</sup> y kanamicina <sup>R</sup>	Este trabajo
pSecTag2B- $\alpha 1$	pSecTag2B <sup>2</sup>	$\alpha 1$	Promotor CMV Región líder Ig $\kappa$ Etiqueta myc-6His Ampicilina <sup>R</sup> y Zeocina <sup>R</sup>	Este trabajo
pCDNA3.1/ Hygro-FLAG	pCDNA3.1/ Hygro (+)	-	Promotor CMV Región líder Ig $\kappa$	Este trabajo
pCDNA3.1/ Hygro- $\alpha 1$ <sup>FLAG</sup>	pCDNA3.1/ Hygro-FLAG <sup>2</sup>	$\alpha 1$	Etiqueta FLAG. Ampicilina <sup>R</sup> e Hygromicina <sup>R</sup>	Este trabajo

<sup>1</sup> Dr. Peter Yurchenco, Robert Wood Johnson Medical School, Department of Pathology, Piscataway, NJ, EE.UU

<sup>2</sup> Life Technologies

Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados para la generación y verificación de  $\alpha 1$ .

Nombre	Secuencia (5'-3')
$\alpha 1$	TTGTAAGCTTTGCAATTGCAACAACCACAGTGATGTCTGT
$\alpha 2$	ATCAAGGTGGCGGCCGCGGTAGATGAAGTCTGAGGCTGATAGGC
$\alpha 3$	TACTACAGAGAAAAGCTCCAG
$\alpha 4$	AAACATCAAAGAAATCACAGAA
$\alpha 5$	AAGGAAAGTGTCGGTACCAGGA
$\alpha 6$	ATAACAATTCAACGCTGATGT
$\alpha 7$	GGCCGCTGACTACAAAGACGATGACGACAAGTGTAATCGATT
$\alpha 8$	CTAGAATCGATTTATCACTTGTCGTCATCGTCTTTGTACTCAGC

A partir del plásmido pCIS-LM $\alpha 1$  (Yurchenco PD et al, 1997) se amplificó mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  (Tabla IV), la región de la cadena  $\alpha 1$  comprendida entre las bases 4227 y 6435 (aminoácidos 1409 y 2145) según la referencia Ensembl [ENSMUSP00000043957](#). El producto de la PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO, siguiendo las indicaciones del sistema *TOPO TA Cloning* (Life Technology). La secuencia se verificó con los oligonucleótidos  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  (Tabla IV). El plásmido resultante pCR2.1-TOPO- $\alpha 1$  se digirió con las enzimas HindIII-NotI y el fragmento (2270 pb) se clonó en el vector pSecTag2B, digerido con las mismas enzimas, generando el vector pSecTag2B- $\alpha 1$  (Tabla III).

Para facilitar la selección e identificación de las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  se generaron vectores con etiquetas peptídicas y genes de resistencia diferentes para cada una de ellas. En el caso de la cadena  $\alpha 1$  se empleó el vector de pcDNA3.1/Hygro (+), con resistencia a higromicina. Previamente este plásmido se digirió con NotI-XbaI para insertar una pareja oligonucleótidos alineados (oligonucleótidos  $\alpha 7$  y  $\alpha 8$ ) que contenía la secuencia codificante de la etiqueta peptídica FLAG (DYKDDDDK). De esta manera se obtuvo el vector pcDNA3.1/Hygro-FLAG. Para obtener el vector pcDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ , el vector pSecTag2B- $\alpha 1$  se digirió con BglII-NotI y el inserto obtenido se clonó en el vector pcDNA3.1/Hygro<sup>FLAG</sup> digerido con las mismas enzimas.

### 2.1.2. Vectores de expresión que codifican variantes truncadas de la cadena $\beta 1$

Los vectores generados para la expresión de variantes truncadas de la cadena  $\beta 1$  ( $t\beta 1$ ) aparecen detallados en la Tabla IV. Los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla V.

Tabla V. Vectores  $\beta 1$  y  $t\beta 1$ .

<i>Vector</i>	<i>Vector origen</i>	<i>Inserto</i>	<i>Características</i>	<i>Proveedor-Referencia</i>
pCIS-LM $\beta 1$	pCIS	LM $\beta 1$	(Yurchenco PD et al, 1997)	Dr. Yurchenco <sup>1</sup>
pCR2.1-TOPO- $t\beta 1$	pCR2.1-TOPO <sup>2</sup>	$t\beta 1$	Promotor lac Ampicilina <sup>R</sup> y kanamicina <sup>R</sup>	Este trabajo
pSecTag2B- $t\beta 1$	pSecTag2B <sup>2</sup>	$t\beta 1$	Promotor CMV Región líder Ig $\kappa$ Etiqueta myc-6His Ampicilina <sup>R</sup> y Zeocina <sup>R</sup>	Este trabajo

<sup>1</sup> Dr. Peter Yurchenco, Robert Wood Johnson Medical School, Department of Pathology, Piscataway, NJ, EE.UU.

<sup>2</sup> Life Technologies

Tabla VI: Oligonucleótidos utilizados para la generación y verificación de  $t\beta 1$ .

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>
$\beta 1$	CTGTGGATCCTGTGTCTGCAATTACCTGGGCACGGTGAAG
$\beta 2$	ATAGTTTAGCGGCCGCTAAGCAGGTGCTGTAAACCGCAACTTTCTC
$\beta 3$	ACCACAACATTGACACTACCGATCCAGA
$\beta 4$	AATTAACTGATACAGCTTCACA
$\beta 5$	AAACTTCCTGACTGAGGATAGT

A partir del plásmido pCIS-LM $\beta 1$  (Yurchenco PD et al, 1997) se amplificó mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos  $\beta 1$  y  $\beta 2$  (Tabla VI), la región de la cadena  $\beta 1$  comprendida entre las bases 3225 y 5502 (aminoácidos 1075 y 1834) según la referencia Ensembl [ENSMUSP00000002979](#). El producto de la PCR se clonó en el vector pCR2.1-TOPO. La secuencia se verificó con los oligonucleótidos  $\beta 3$ ,  $\beta 4$ , y  $\beta 5$  (Tabla VI). El

plásmido resultante pCR2.1-TOPO-t $\beta$ 1, se digirió con las enzimas BamHI-NotI y el fragmento (2291 pb) se clonó en el vector pSecTag2B, digerido con las mismas enzimas, generando el vector pSecTag2B-t $\beta$ 1 (Tabla V).

### 2.1.3. Vectores de expresión que codifican variantes truncadas de la cadena $\gamma$ 1

Los vectores generados para la expresión de variantes truncadas de la cadena  $\gamma$ 1 ( $\gamma$ 1) aparecen detallados en la Tabla VI. Y los oligonucleótidos utilizados se describen en la Tabla VII.

Tabla VII. Vectores  $\gamma$ 1 y  $\gamma$ 1.

<i>Vector</i>	<i>Vector origen</i>	<i>Inserto</i>	<i>Características</i>	<i>Proveedor-Referencia</i>
pSecTag2B- $\gamma$ 1 <sup>HA</sup>	pSecTag2B <sup>1</sup>	$\gamma$ 1 <sup>HA</sup>	Promotor CMV Región líder Ig $\kappa$	GENEART AG
pSecTag2B- $\gamma$ 1	pSecTag2B <sup>1</sup>	$\gamma$ 1	Etiqueta myc-6His Ampicilina <sup>R</sup> y Zeocina <sup>R</sup>	Este trabajo
pCDNA3.1/Neo- $\gamma$ 1 <sup>HA</sup>	pCDNA3.1/Neo (+) <sup>1</sup>	$\gamma$ 1 <sup>HA</sup>	Promotor CMV Región líder Ig $\kappa$ Etiqueta FLAG. Ampicilina <sup>R</sup> e Hygromicina <sup>R</sup>	Este trabajo

<sup>1</sup> Life Technologies

Tabla VIII. Oligonucleótidos utilizados para la generación y verificación de  $\gamma$ 1

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia (5'-3')</i>
$\gamma$ 1	ATCTTTATCGATTTTGC
$\gamma$ 2	GGCCGCAAAATCGATAAAGAT

A partir de la secuencia Ensembl [ENSMUSP00000027752](#) se diseñó una construcción génica de 2007 pb flanqueada por los sitios de restricción HindIII-NotI que contiene la región de la cadena gamma comprendida entre las bases 1827 y 2784 (aminoácidos 609 y

928), un espaciador peptídico flexible (*linker*) de 4 aminoácidos y la secuencia codificante de la etiqueta peptídica HA (YPYDVPDYA), que fue sintetizada por GENEART AG en el vector pSecTag2B. El plásmido resultante pSecTag2B-ty1<sup>HA</sup> se digirió con las enzimas NdeI-NotI obteniendo un fragmento de 2605 pb que se insertó en el vector pCDNA3.1/Neo dando lugar al plásmido pCDNA3.1/Neo-ty1<sup>HA</sup>.

Para restaurar la etiqueta peptídico Myc-6his y generar el plásmido pSecTag2B-ty1, el plásmido pSecTag2B-ty1<sup>HA</sup> se digirió con las enzimas EcoRV-NotI para insertar una pareja oligonucleótidos alineados (oligonucleótidos  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ ) que contenían un sitio interno ClaI.

### 3. TRANSFECCIONES

La línea celular HEK-293 se transfectó con los vectores pSecTag2B.t $\alpha$ 1, pSecTag2B.t $\beta$ 1 o pSecTag2B.ty1 usando *Superfect* según las recomendaciones del fabricante (Qiagen). La línea celular 293F se transfectó con los tres vectores (pSecTag2B.t $\alpha$ 1, pSecTag2B.t $\beta$ 1 o pSecTag2B.ty1) usando *293fectin* según las recomendaciones del fabricante (Life Technologies). Los sobrenadantes se recogieron a diferentes tiempos y se analizaron mediante ELISA y transferencia *western*.

### 4. EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE UN FRAGMENTO TRUNCADO HETEROTRIMÉRICO $\alpha\beta\gamma$ (t $\alpha\beta\gamma$ 1)

Para estudiar el nivel de expresión de variantes truncadas individuales (t $\alpha$ 1, t $\beta$ 1, o ty1) o del fragmento truncado heterotrimérico  $\alpha 1\beta 1\gamma 1$  de la LM-111 (t $\alpha\beta\gamma$ 1), los transfectantes se cultivaron en DMEM con 1% FCS (células HEK-293) o en *FreeStyle*<sup>TM</sup> 293 expression medium (células 293F). El medio condicionado fue recogido, centrifugado y filtrado (0.45  $\mu$ m) y la presencia de proteína recombinante se analizó mediante transferencia *western* y ELISA. El fragmento t $\alpha\beta\gamma$ 1 se purificó a partir de medio condicionado procedente de cultivos de células 293F transfectadas, mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC) usando una columna HisTrap HP (GE Healthcare) previamente equilibrada en 0.5 M NaCl, 5 mM imidazol (pH 7.4) y eluida con 0.5 M NaCl, 200 mM imidazol (pH 7.4) usando un sistema ÄKTA Prime plus (GE Healthcare).

El t $\alpha\beta\gamma$ 1 purificado se dializó frente a PBS, se analizó mediante SDS-PAGE y ELISA y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

## 5. ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS EN FASE SÓLIDA (ELISA)

### 5.1.ELISAs para la detección de variantes truncadas $\alpha 1$ , $\beta 1$ , o $\gamma 1$ individuales

Los AcMo anti-Flag (clon M2) o anti-HA (clon 12CA5), ambos de Abcam, o el AcMo anti-c-myc (clon 9E10) de Sigma-Aldrich, se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) mediante incubación 16 horas a 4 °C en PBS (1  $\mu$ g/pocillo). Posteriormente las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con PBS-2% BSA durante 2 horas a 37 °C y se añadió medio condicionado o proteína purificada. El ensayo se reveló con un Ac de conejo anti-LM-111 murina (2  $\mu$ g/ml) de Sigma-Aldrich y posteriormente con un Ac de burro anti-IgG de conejo conjugado a HRP (dilución 1/2500) de Amersham Bioscience.

### 5.2.ELISA para la detección de variantes truncadas $\alpha 1$ - $\beta 1$ o $\beta 1$ - $\gamma 1$ asociadas

Los AcMo anti-Flag, el AcMo anti-HA, o el AcMo anti-c-myc de Sigma-Aldrich se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) mediante incubación de 16 horas a 4 °C en PBS (1  $\mu$ g/pocillo). Posteriormente las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con 2% PBS-BSA durante 1 h a 37° C, y se añadió LM-111 nativa intacta purificada o  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado (1  $\mu$ g/pocillo) durante 1 h a temperatura ambiente. Las proteínas se detectaron con un AcMo anti-His (clon 3H2201) conjugado con biotina (dilución 1/500) durante 1 h a temperatura ambiente, y posteriormente con estreptavidina conjugada con HRP (dilución 1/1000).

### 5.3.ELISA para la caracterización inmunológica del $\alpha\beta\gamma 1$

Las proteínas purificadas (LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$ ) se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) mediante una incubación de 16 horas a 4 °C en PBS (1  $\mu$ g/pocillo). Posteriormente las placas se lavaron con PBS, se bloquearon con 2% PBS-BSA durante 1 h a 37° C, y se añadió un Ac de conejo anti-LM-111 (0.5  $\mu$ g/pocillo), el Ac L36 en formato scFv (0.5  $\mu$ g/pocillo) (Sanz L et al, 2001) o el Ac 2.15 en formato scFv (0.5  $\mu$ g/pocillo) (Sanchez-Martin D et al, 2011) durante 1 h a temperatura ambiente. Los Acs

unidos al antígeno se detectaron con el Ac de burro anti-IgG de conejo (dilución 1/5000) conjugado a HRP o proteína A conjugada a HRP (GE Healthcare).

### 6. Transferencia *western*

Las muestras (medio condicionado o proteína purificada) se analizaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), utilizando geles con un gradiente de 4-12% (Life Technologies). A continuación, las proteínas fueron transferidas por *electroblotting* a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema iBlot® *Western Blotting System* y los reactivos del *kit iBlot®Gel Transfer Stacks Nitrocellulose* (Life Technologies). La membrana fue bloqueada con *Odyssey Blocking Buffer* (Li-COR Biosciences), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las proteínas, que presentaban una etiqueta peptídica *myc*, se detectaron con el AcMo anti-c-myc (1 µg/mL), las que presentaban una etiqueta peptídica *flag* se detectaron con el AcMo anti-flag (1 µg/mL) y las que presentaban una etiqueta peptídico HA con el AcMo anti-HA (2 µg/mL), diluidos en solución de bloqueo, durante 1 hora. Tras varios lavados con PBS-0,05% Tween20 y con PBS, la membrana se incubó durante 30 minutos con un Ac de burro anti-IgG de ratón conjugado con IRDye800 (Rockland Immunochemicals), un fluorocromo con emisión cercana al infrarrojo (NIR), diluido en solución de bloqueo (1/15000). Tras lavar la membrana con PBS-0,05% Tween20 y PBS las bandas se visualizaron mediante el sistema de detección de fluorescencia y quimioluminiscencia *Odyssey® Infrared Imaging system* (Li-COR Biosciences).

### 7. Caracterización estructural del $\alpha\beta\gamma 1$ purificado

Estos estudios se realizaron en colaboración con la Unidad de Biología Estructural del CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia en Derio.

#### 7.1. Curvas de dicroísmo circular (DC)

Este análisis se realizó en un espectropolarímetro Jasco-810. El análisis se realizó en un rango de longitudes de onda comprendido entre 185 y 250 nm, con un tiempo de integración de 1 segundo cada 0,1 nm y una anchura de 1 nm (Blanco FJ et al, 1994). La concentración de la muestra (0,18 mg/ml en PBS) se determinó empleando cubetas de cuarzo de 0,01 cm de recorrido mediante absorbancia a 280 nm y a 25 °C de temperatura.



## 7.2. Curvas de estabilidad térmica

Se emplearon cubetas de cuarzo de 0,2 cm de recorrido para determinar la concentración de muestra a denaturalizar. Las curvas de estabilidad térmica se llevaron a cabo en muestras a una concentración de 0,03 mg/ml en PBS, desnaturalizando la proteína mediante un aumento de la temperatura de 1 °C/min (usando un Peltier termoeléctrico programable) y monitorizando la elipticidad a 222 nm.

## 7.3. Purificación *MultiAngle Laser Scattering* (MALLs)

Se emplearon columnas de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) WTC-100S5 de 7,8 mm x 300 mm, con un rango de separación de 50.000-7.500.000 Da (Wyatt, Technology Corporation), conectadas al detector de dispersión de luz multiángulo DAWN-HELEOS (Wyatt). La columna se equilibró con una solución de 0,03% NaN<sub>3</sub> en PBS filtrada al 0,1 µm, y el sistema se equilibró con BSA (Sigma-Aldrich). Se inyectó 120 µl de muestra con una concentración de 0,1 mg/ml a un flujo de 0,5 ml/min. La adquisición de los datos y el análisis se llevó a cabo empleando el programa ASTRA versión 5.3.4.19 (Wyatt).

# 8. Caracterización funcional del $\alpha\beta\gamma 1$ purificado

## 8.1. Ensayos de inmunofluorescencia

La unión de LM-111 y de  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado a receptores de membrana se estudió en células HT-1080 mediante citometría de flujo (CF). Las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C en presencia de diferentes cantidades de cada una de las proteínas (9-50 µg/ml). Tras los lavados se añadió un Ac de conejo anti-LM-111 o un AcMo anti-histidina (5 µg/ml), seguido de un Ac anti-IgG de conejo conjugado con FITC (dilución 1/160) o un Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con PE (dilución 1/100). Los estudios se realizaron en un EPICS XL (Coulter Electronics) equipado con un láser de argón (488 nm).

Para estudiar el patrón de distribución de la LM-111 y del  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado células HT-1080 se incubaron en medio completo sobre cámaras *Lab-Tek* (Termo Fisher) a 37 °C. Posteriormente se lavaron con medio libre de suero y se incubaron durante 1 hora a 4 °C en presencia de LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$  (50 µg/ml) en PBS 1% BSA. Después de lavar las células con PBS se fijaron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 3,7% de paraformaldehído. Tras otro lavado se añadió la solución con los Acs primarios (Ac de conejo anti-LM-111 o un AcMo anti-myc) en PBS 1% BSA y se incubó durante toda la

noche a 4 °C. Después de lavar una vez con PBS, y dos veces con PBS 1% BSA, las células se incubaron durante una hora a 4 °C con un Ac anti-IgG de conejo conjugado con FITC o un Ac de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC respectivamente. Después de lavar varias veces con PBS los núcleos se tiñeron con una solución To-Pro-3 (Invitrogen Life Technology). Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal TCS-SP5 (Leica Microsistemas, SLU).

### 8.2. Ensayos de adhesión celular

Estos ensayos se efectuaron con tres tipos de células diferentes: HT-1080, HUVEC y HBVP (Tabla II). Diferentes cantidades de  $\alpha\beta\gamma 1$  o LM-111 se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon, BD Biosciences) mediante una incubación de 16 horas a 4 °C en PBS. Después de lavar la placa con PBS, se bloqueó durante una hora a 37 °C con el medio basal de cada tipo celular suplementado con 3% (vol/vol) de FCS y se añadieron las células ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) resuspendidas en el medio basal correspondiente. Tras un periodo de incubación de 30 minutos a 37 °C, las células no adheridas se eliminaron mediante lavados sucesivos con PBS, y se añadió (100  $\mu$ l/pocillo) el substrato *CellTiter-Glo* (Promega), y la bioluminiscencia se cuantificó usando un luminómetro *Infinite F200* (Tecan).

### 8.3. Ensayos de inhibición de la adhesión celular

Para estudiar el potencial efecto modulador del  $\alpha\beta\gamma 1$  sobre la adhesión celular, células HT-1080 y HUVEC se resuspendieron en medio basal en ausencia o en presencia de diferentes concentraciones (5-20  $\mu$ g/ml) de  $\alpha\beta\gamma 1$ . Tras un periodo de incubación de 30 minutos a 4 °C, las células ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) se añadieron sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo en las que se se había inmovilizado LM-111. Tras un periodo de incubación de 30 minutos a 37 °C, las células no adheridas se eliminaron mediante lavados sucesivos con PBS, se añadió (100  $\mu$ l/pocillo) del substrato *CellTiter-Glo*, y la bioluminiscencia se cuantificó usando un luminómetro de placas *Infinite F200*.

### 8.4. Ensayos de *cell rounding*

Para analizar el efecto del  $\alpha\beta\gamma 1$  sobre la morfología celular se emplearon células HT-1080 y HUVEC. El  $\alpha\beta\gamma 1$  o la LM-111 se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo, mediante una incubación de 16 horas a 4 °C en PBS. Después de lavar la

placa con PBS, se bloqueó durante 1 hora a 37 °C con el medio completo de cada tipo celular y se añadieron las células ( $1 \times 10^4$  células/pocillo) resuspendidas en el medio basal correspondiente. Tras una incubación de 45 minutos, 3 y 5 horas a 37 °C se tomaron imágenes de cada pocillo mediante un microscopio invertido (Nikon Eclipse Ti, Nikon Corp.) equipado con una cámara digital. El porcentaje de células con morfología redondeada se determinó a partir de imágenes (200x) de tres campos ópticos elegidos aleatoriamente.

### 8.5. Ensayos de reorganización del citoesqueleto

Para estudiar el efecto del  $\alpha\beta\gamma 1$  sobre la reorganización del citoesqueleto de actina, células HT-1080 se incubaron sobre  $\alpha\beta\gamma 1$  o LM-111 inmovilizado (10  $\mu\text{g/ml}$ ) en cámaras *Lab-Tek*. Tras un periodo de incubación de 3 horas 37 °C las células se fijaron con una solución de paraformaldehído 2% en PBS y se permeabilizaron con una solución de Triton X-100 al 0,1% en PBS. Para visualizar el citoesqueleto de actina las células se incubaron durante 20 minutos con una solución (0,5  $\mu\text{mol/L}$ ) de faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 (Life Technologies) en PBS suplementado con 1% BSA. Las imágenes se capturaron en un microscopio confocal TCS-SP5.

### 8.6. Ensayos de proliferación celular

Para estudiar el efecto del  $\alpha\beta\gamma 1$  sobre la proliferación, células HT-1080 y HUVEC se inmovilizaron sobre placas de 96 pocillos de fondo redondo en las que previamente se había inmovilizado  $\alpha\beta\gamma 1$  o LM-111 (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Tras lavar y bloquear con el medio completo correspondiente a cada tipo celular, se añadieron las células ( $2 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^4$  o  $2 \times 10^3$ /pocillo), y se incubaron a 37°C durante periodos de 48, 72 o 144 horas respectivamente. El número relativo de células en cada tiempo y condición se determinó mediante la adición (100  $\mu\text{l/pocillo}$ ) del sustrato *CellTiter-Glo*, y la bioluminiscencia se cuantificó usando el luminómetro de placas *Infinite F200*.

### 8.7. Ensayos de ciclo celular

Para el análisis del ciclo celular, células HT-1080 se fijaron en una solución de etanol 70% en PBS durante 1 hora a 4 °C. Después de lavar las células se resuspendieron en una solución que contenía 0,1 % Triton-X, RNase A (100  $\mu\text{g/ml}$ ) e yoduro de propidio (50

µg/ml) en PBS, y se incubó durante 30 minutos a 37°C. El porcentaje de células en cada fase del ciclo se determinó mediante CF en un citómetro EPICS XL (Coulter Electronics).

## 9. ESTUDIOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL

Estos estudios se realizaron en células HT-1080 incubadas durante un periodo de 16 horas a 37 °C sobre placas de 24 pocillos de fondo plano (Falcon, BD Bioscience) en los que previamente se había inmovilizado BSA o  $\alpha\beta\gamma 1$  (10µg/ml).

### 9.1. Aislamiento de ARN total

El ARN total se aisló con el sistema *RNeasy Micro Kit*, siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen). Las muestras se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific) y la integridad del ARN se analizó usando un Bioanalyzer 2100B (Agilent Technologies).

### 9.2. *Microarrays* de ADN

El análisis del perfil transcripcional se efectuó en el Centro de Genómica y Proteómica, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid. El *microarray* empleado para el análisis fue el *GeneChip® Human Gene 1.0 ST* (Affymetrix). Por cada *microarray* se utilizaron 250 ng de ARN total.

### 9.3. Validación de los resultados de los *microarrays* de ADN mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Para realizar el proceso de validación de los resultados de los *microarrays* se seleccionaron diez genes dentro de aquéllos que mostraban una diferencia en el perfil de expresión o *fold change* de  $\geq 2$  con respecto al control (implicados en remodelación de la matriz, movilidad celular y progresión tumoral) y se diseñaron oligonucleótidos específicos para ellos (Tabla IX) utilizando el programa *Primer Express oligo design* (Applied BioSystems).

Tabla IX. Oligonucleótidos utilizados para la validación mediante qRT-PCR.

<i>Nombre del gen</i>	<i>Símbolo del gen</i>	<i>Secuencia oligo (5'-3')</i>
Inductor de muerte celular BH3-like	BLID	GGCAGTTCCATTATCCAGA
Glicoproteína NMB, osteoactivina	GPNMB	GGAGACATGAGGTGGAAA
Interleuquina 24	IL-24	CAAAGCCTGTGGACTTTAG
Proteína de la matriz Gla.	MGP	ACAGGAGAAATGCAAATACC
Metaloproteínasa 2	MMP2	GAGTTGGCAGTGCAATAC
Metaloproteínasa 13	MMP13	TGAGGAAGACCTCCAGTT
Proteína relacionada con cáncer de ovario 1	OCR1	GTTTCTGCGCTTGAAGTC
Osteopontina	SPP1	CCCATCTCAGAAGCAGAAT
Versicano	VCAN	GTGTCACTGACTGTGGAT
Familia WNT, miembro 5A.	WNT5A	GACATCGAAGGTGGAAC

El cDNA se sintetizó a partir de 250 ng de ARN total con el sistema *SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit* (Life Technologies). La PCR en tiempo real se efectuó en un equipo *LightCycler 480* (Roche Applied Science) empleando el sistema *LightCycler 480 SYBR Green I Master kit* y el programa siguiente: desnaturalización inicial de 3 minutos seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 95 °C y 7 segundos a 59 °C. La expresión relativa de cada ARN fue normalizada con respecto a la expresión del gen de referencia de la enzima succinato deshidrogenasa (SDHA), empleando la fórmula  $2^{-Ct(\text{gen de interés})} / 2^{-Ct(\text{SDHA})} = 2^{-\Delta Ct}$ . El potencial efecto modulador del  $\alpha\beta\gamma 1$  sobre la expresión génica se determinó calculando la *ratio* entre la expresión relativa de cada gen en las muestras tratadas y su expresión en el control negativo (*fold change*).

## 10. ESTUDIOS DE VALIDACIÓN FUNCIONAL

### 10.1. Ensayos de migración celular

Las células HT-1080 se incubaron durante un periodo de 16 hora a 37 °C sobre pocillos en los que previamente se había inmovilizado BSA o  $\alpha\beta\gamma 1$  (10 µg/ml). Transcurrido este periodo las células se despegaron, se contaron, se resuspendieron en 250 µl de DMEM suplementado con 0,1% BSA y se aplicaron ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo) en la parte superior de una cámara de Boyden (diámetro del poro 8 µm) en formato de 24 pocillos (Falcon, BD Biosciences). Previamente, en la cámara inferior se había añadido 750 µl de DMEN-C o DMEM suplementado con 0,1% BSA (control negativo). Tras un periodo de incubación de 4 horas a 37 °C, las células que no habían migrado se retiraron de la parte superior de los insertos y se extrajeron los filtros en cuya cara inferior habían quedado adheridas las células que habían migrado. Estos filtros se depositaron en placas de 96 pocillos con medio

completo. El número relativo de células migratorias se determinó mediante bioluminiscencia en el luminómetro de placas Infinite F200, empleando el ensayo *CellTiter-Glo*.

### 10.2. Ensayos de invasión celular

Las células HT-1080 se incubaron durante un periodo de 16 horas a 37 °C sobre pocillos en los que previamente se había inmovilizado BSA o  $\alpha\beta\gamma 1$  (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Transcurrido este periodo las células se despegaron, se contaron, se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de DMEM suplementado con 0,1% BSA y se aplicaron ( $2,5 \times 10^4$  células/pocillo) en la parte superior de una cámara de invasión (diámetro del poro 8  $\mu\text{m}$  cubierto con Matrigel) en formato de 24 pocillos (Falcon, BD Biosciences). Previamente, en la cámara inferior se había añadido 750  $\mu\text{l}$  de DMEN-C o DMEM suplementado con 0,1% BSA (control negativo). Tras un periodo de incubación de 4 horas a 37 °C, las células que no habían migrado se retiraron de la parte superior de los insertos y se extrajeron los filtros en cuya cara inferior habían quedado adheridas las células que habían migrado. Estos filtros se depositaron en placas de 96 pocillos con medio completo. El número relativo de células migratorias se determinó mediante bioluminiscencia en el luminómetro de placas Infinite F200, empleando el ensayo *CellTiter-Glo*.

### 10.3. Ensayos de zimografía

Para la determinación de la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP-2 y MMP-9), medio condicionado de células HT-1080 cultivadas durante periodos de tiempo variable, en placas de 96 pocillos previamente tratadas con LM-111,  $\alpha\beta\gamma 1$  o BSA (10  $\mu\text{g/ml}$ ) se sometió a electroforesis en geles *precast* con 10% de poliacrilamida y 0,1% de gelatina (Life Technologies). Los geles se trataron de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se tiñieron con una solución de azul de coomassie 0,1%. Al desteñir, la actividad enzimática se revela como bandas blancas (por la digestión de la gelatina) del tamaño correspondiente a cada MMP. Las bandas fueron cuantificadas mediante densitometría.

## 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La existencia de diferencias significativas entre los distintos grupos se evaluó mediante test no paramétricos de Kruskal-Wallis para estudiar las diferencias entre los grupos y el test de U de Mann-Whitney en la evaluación de las diferencias entre cada par de grupos.

Ambos test son análogos al análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y evalúan la hipótesis nula de que dos (Mann-Whitney) o más (Kruskall-Wallis) muestras proceden de la misma población. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con la extensión XLStat para MS Excel. La representación gráfica de los datos se realizó mediante el programa Graphpad.





## RESULTADOS



## 1. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN VARIANTES TRUNCADAS DE LA CADENA $\alpha 1$

1.1. Diseño de construcciones génicas que comprende la región *coiled-coil* y tres dominos tipo laminina *EGF-like* de la cadena  $\alpha 1$

La mayoría de los fragmentos proteolíticos derivado de la LM-111, así como la mayoría de los fragmentos recombinantes generados comprenden dominios globulares amino-terminales o carboxi-terminales, y sólo dos de estos fragmentos (E8, C8-9) contienen segmentos parciales de la región heterotrimérica con estructura *coiled-coil* (Goodman SL et al, 1989; Hunter I et al, 1990; Nomizu M et al, 1994), en ambos casos asociados con tres dominios LG globulares (Figura 10).

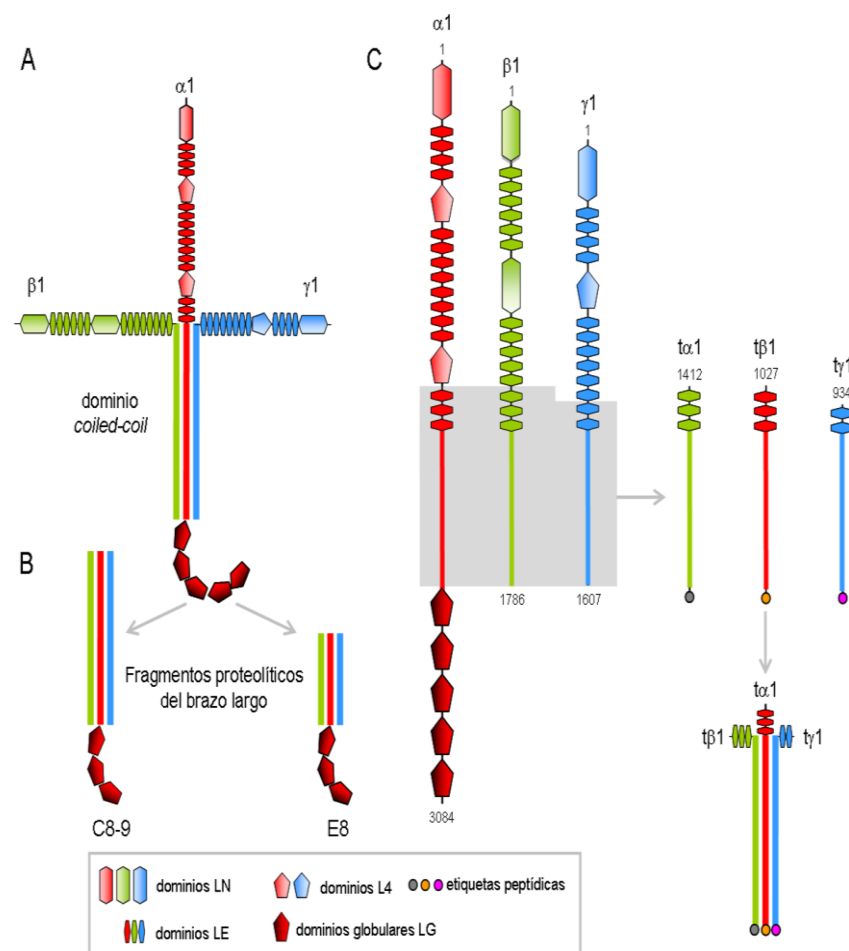


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de la LM-111 (A) y de los fragmentos proteolíticos derivados del brazo largo (B), mediante tratamiento con elastasa (E8) o catepsina G (C8-9). Representación esquemática de la organización en dominios de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$ , y representación esquemática del fragmento recombinante heterotrímérico generado a partir de variantes truncadas de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  (C). Numeración según Sasaki M et al, 1988.

Para estudiar con mayor precisión la función biológica del dominio *coiled-coil* de la LM-111 (CCL1) se construyeron moléculas de ADN recombinante que comprenden el dominio CCL1 completo de las cadena  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  (Figura 10). Dado que las variantes cortas de la cadena  $\alpha$  ( $\alpha 3A$  y  $\alpha 4$ ) contienen algunos módulos de tipo LE (Kleinman HK et al, 1985; Aumailley M et al, 2005), se decidió incluir tres módulos LE (15, 16 y 17) en la cadena  $\alpha 1$  truncada ( $t\alpha 1$ ) (Figura. 10).

Como molde para la construcción de la  $t\alpha 1$  se utilizó el plásmido pCIS-LM $\alpha 1$  que contiene la región codificante completa de la cadena  $\alpha 1$  murina (Colognato-Pyke H et al, 1995). La secuenciación reveló la presencia de algunos cambios en el dominio CCL1 $\alpha$  con respecto a la secuencia teórica M. Sasaki (Sasaki M et al, 1988) (Figura. 11).

```

 $\alpha$ teórica CNCNNHSDVCDPETGKCLSCRDHTSGDHCELCASGYGKVTGLPGDCTPCTCPHHPPFSFSPTCVVEGDS
pCIS-LM $\alpha 1$  CNCNNHSDVCDPETGKCLSCRDHTSGDHCELCASGYGKVTGLPGDCTPCTCPHHPPFSFSPTCVVEGDS
*****

 $\alpha$ teórica DFRCNACLPGYEGQYCERCSAGYHGNPRAAGGSCQTCDCNPQGSVHSDCDRASGCVCCKPGATGLHCEKC
pCIS-LM $\alpha 1$  DFRCNACLPGYEGQYCERCSAGYHGNPRAAGGSCQTCDCNPQGSVHSDCDRASGCVCCKPGATGLHCEKC
*****

 $\alpha$ teórica LPRHILMESDCVSCDDDCVGP LLNDLDSVGDVLSLNLTVSPAPYGI LENLENTTKYFQRYLIKENAKK
pCIS-LM $\alpha 1$  LPRHILMESDCVSCDDDCVGP LLNDLDSVGDVLSLNLTVSPAPYGI LENLENTTKYFQRYLIKENAKK
*****

 $\alpha$ teórica IRAEIQLLEGIAEQTENLQKELTRVLARHQKVNAEMERTSNGTQALATFIEQLHANIKEITEKVATLNQTA
pCIS-LM $\alpha 1$  IRAEIQLLEGIAEQTENLQKELTRVLARHQKVNAEMERTSNGTQALATFIEQLHANIKEITEKVATLNQTA
*****

 $\alpha$ teórica RKDFQPPVSALQSMHQNISSLLGLIKERNFTEMQONATLELKAADLLSRIQKRFQKPKQEKALKALKEANS
pCIS-LM $\alpha 1$  RKDFQPPVSALQSMHQNISSLLGLIKERNFTEMQONATLELKAADLLSRIQKRFQKPKQEKALKALKEANS
*****

 $\alpha$ teórica LLSNHSEKLQAAEELLKEAGSKTQESNLLLLLVKANLKEFQEKKL RVQEEQNVTSELI AKGREWVDAAG
pCIS-LM $\alpha 1$  LLSNHSEKLQAAEELLKEAGSKTQESNLLLLLVKANLKEFQEKKL RVQEEQNVTSELI AKGREWVDAAG
*****

 $\alpha$ teórica THTAAQDTLTQLEHHRDELLWARKIRSHVDDLVMQMSKRRARDLVHRAEQHASELQSRAGALDRDLEN
pCIS-LM $\alpha 1$  THTAAQDTLTQLEHHRDELLWARKIRSHVDDLVMQMSKRRARDLVHRAEQHASELQSRAGALDRDLEN
*****

 $\alpha$ teórica VRNVSLNATSAAHVHSNIQTLTEEAEMLAADAHKTANKTDLISESLASRGKAVLQRSSRFLKESVGTTRK
pCIS-LM $\alpha 1$  VRNVSLNATSAAHVHSNIQTLTEEAEMLAADAHKTANKTDLISESLASRGKAVLQRSSRFLKESVGTTRK
*****

 $\alpha$ teórica QQGITMKLDELKNTLSQFQESVDNITKQANDSLAMLRESPPGGMREKGRKARELAAAANESAVKTLEDVLA
pCIS-LM $\alpha 1$  QQGITMKLDELKNTLSQFQESMDNIMKQANDSLAMLRESPPGGMREKGRKARELAAAANESAVKTLEDVLA
*****

 $\alpha$ teórica LSLRVFNTSEDL SRVNATVQETNDLLHNSTMTLLAGRKMKDMEMQANLLLDRLKPKLTLEENLSRNLSE
pCIS-LM $\alpha 1$  LSLRVFNTSEDL SRVNATVQETNDLLHNSTMTLLAGRKMKDMEMQANLLLDRLKPKLTLEENLSRNLSE
*****

 $\alpha$ teórica IKLLISRARKQAASI KVAVSADRD CIRAYQPQTSSST
pCIS-LM $\alpha 1$  IKLLISRARKQAASI KVAVSADRD CIRAYQPQTSSST
*****

```

Figura 11. Alineamiento de la cadena  $\alpha 1$  teórica y de la cadena  $\alpha 1$  del plásmido pCIS-LM $\alpha 1$ .

Una delección del codón GAG en la posición 5444 que origina la pérdida del ácido glutámico en la posición 1775 (numeración según (Sasaki M et al, 1988)), y dos cambios; uno conservativo en la posición 1968 (V1968M) y otro no conservativo en la posición 1972 (T1972M). De acuerdo con los datos existentes en la literatura (Sasaki M et al, 1988;

Nomizu M et al, 1996), y a las predicciones realizadas con el programa Multicoil es poco probable que estos cambios puedan comprometer la estructura *coiled-coil*. (Figura 12).

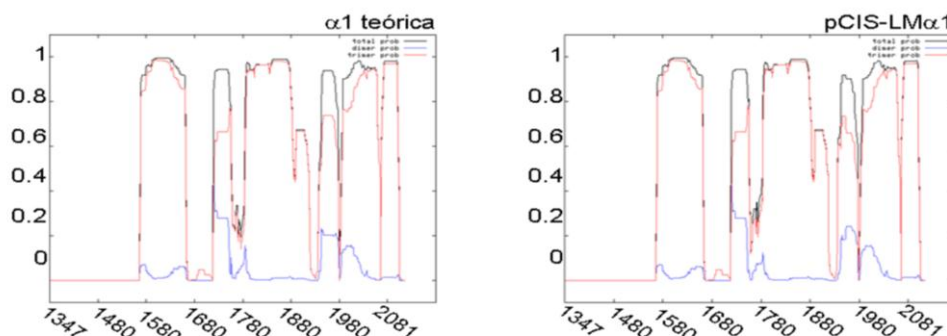


Figura 12. Predicciones realizadas con el programa Multicoil de la cadena  $\alpha 1$  teórica y de la cadena  $\alpha 1$  del plásmido pCIS-LM $\alpha 1$ .

### 1.1.1. Construcción de vectores de expresión eucariota para la secreción de variantes truncadas de la cadena $\alpha 1$ ( $\alpha 1$ )

Con el objetivo de estudiar los niveles de expresión y secreción de la  $\alpha 1$  en un sistema celular eucariótico se construyeron los vectores pSecTag2B $\alpha 1$  y pCDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ . Para construir el vector pSectag2B $\alpha 1$  la región codificante del dominio CCL1 $\alpha$  completo y los módulos LE 15, 16 y 17 (aminoácidos 1347 a 2087), derivada del vector pCIS- $\alpha 1$  se clonó en el plásmido pSecTag2B (Figura 13).

El vector pSecTag2B $\alpha 1$  (Figura 14) incorpora en una única unidad transcripcional, bajo el control del promotor CMV, la región líder de la Ig $\kappa$  murina, la secuencia codificante de la  $\alpha 1$  y la secuencia codificante de las etiquetas peptídicas c-myc (EQKLISEEDL) y polidistidina (HHHHHH). Para construir el plasmido pCDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{\text{FLAG}}$  (Figura 14) el vector pSectag2B $\alpha 1$  se digirió con BglII-NotI y el fragmento obtenido se clonó en el vector pCDNA3.1/Hygro $^{\text{FLAG}}$ , que contiene la secuencia codificante de la etiqueta peptídica FLAG (DYKDDDDK).

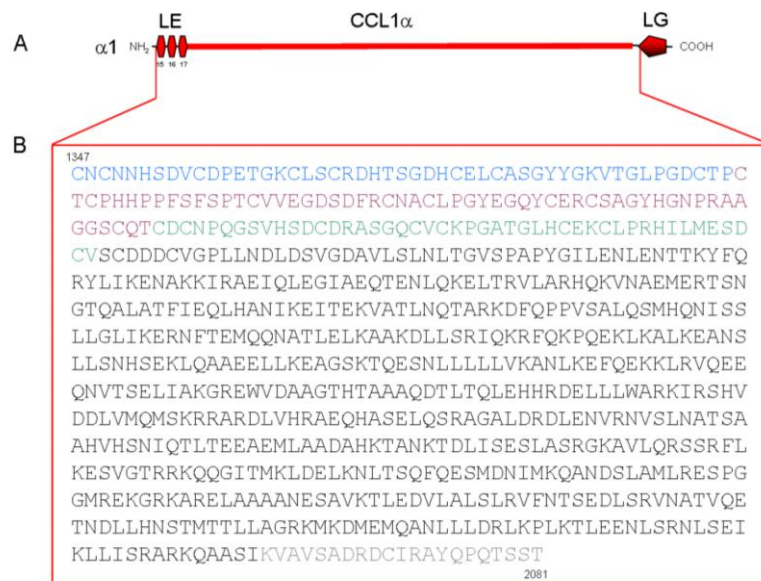


Figura 13: Representación esquemática y secuencia de aminoácidos de la cadena  $\alpha 1$  truncada. En negro se representa la secuencia del dominio CCL1 $\alpha$ , en azul, violeta y verde la secuencia de los módulos LE 15, 16 y 17 respectivamente; y en gris el inicio de la secuencia del dominio LG globular proximal.

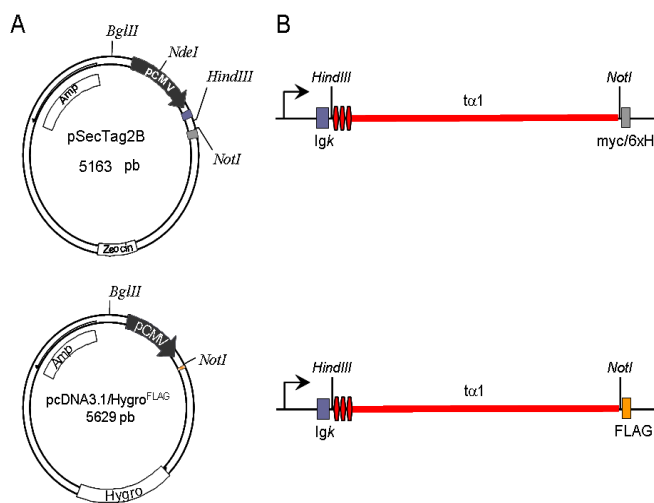


Figura 14 Representación esquemática de los vectores de expresión y de las construcciones génicas para la expresión en células eucarióticas de las cadenas  $\alpha 1$  truncadas.

### 1.1.2. Producción y caracterización de la cadena $\alpha 1$

Células humanas HEK-293 fueron transfectadas con los vectores pSecTag2B $\alpha 1$  o pcDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ . A las 48 horas se determinó la eficiencia de transfección mediante CF y los niveles de secreción de la proteína  $\alpha 1$  mediante ELISA (Figura 15). En el medio condicionado de las células transfectadas con el plásmido pEGFPN1 no se detectó secreción de  $\alpha 1$ , mientras que en el medio condicionado de las células

transfectadas con el plásmido pSecTag2Bt $\alpha$ 1 o con el plásmido pCDNA3.1/Hygro- $\alpha$ 1<sup>FLAG</sup> se detectó la presencia de  $\alpha$ 1 (Figura 15).

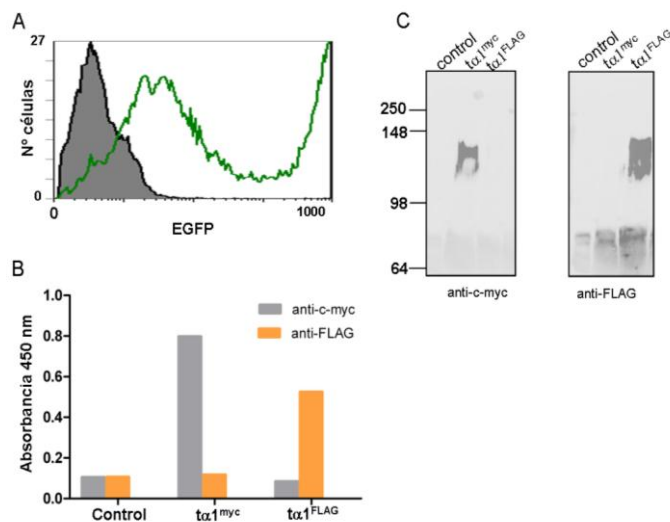


Figura 15. Análisis mediante CF de la expresión de EGFP en células HEK-293 no transfectadas (gris) o transfectadas con el vector pEGFN1 (A). Análisis mediante ELISA (B) y mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras (C) de los medios condicionados obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el vector pEGFN1 (control), con el vector pSectag2Bt $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1<sup>myc</sup>) o con el vector pcDNA3.1/Hygro<sup>FLAG</sup> ( $\alpha$ 1<sup>FLAG</sup>).

La caracterización estructural se realizó mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras. Como se observa en la Figura 15C la cadena  $\alpha$ 1<sup>myc</sup> y la cadena  $\alpha$ 1<sup>FLAG</sup> se secretaron eficientemente y mostraron un tamaño molecular ligeramente superior al estimado. Estas diferencias de movilidad relativa pueden atribuirse a la glicosilación, ya que en la LM-111 se han descrito 74 sitios de glicosilación potenciales localizados en las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , principalmente en el brazo largo (Beck K et al, 1990).

## 2. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN VARIANTES TRUNCADAS DE LA CADENA $\beta$ 1

### 2.1. Diseño de construcciones génicas que comprende la región *coiled-coil* y tres dominos tipo laminina *EGF-like* de la cadena $\beta$ 1

Para el diseño de la cadena  $\beta$ 1 truncada (t $\beta$ 1), carente de dominios globulares amino terminales, nos basamos en la información disponible sobre las modificaciones proteolíticas del brazo corto de la cadena  $\beta$ 3 (Remy L et al, 2006), que mantiene algunos módulos tipo LE. Como molde para la construcción de la t $\beta$ 1 se utilizó el plásmido pCIS-LM $\beta$ 1 que

## RESULTADOS

contiene la región codificante completa de la cadena  $\beta 1$  murina (Yurchenco PD et al, 1997).

$\beta 1$ teórica	CVCNYLGTVEKHCNGSDCHCDKATGQCSCLPNVIGQNCDCAPNTWQLASGTGCGPCNCNAHSFGPSC
pCIS-LM $\beta 1$	CVCNYLGTVEKHCNGSDCHCDKATGQCSCLPNVIGQNCDCAPNTWQLASGTGCGPCNCNAHSFGPSC
$\beta 1$ teórica	NEFTGQCQCMPGFGGRTCSQCQELFWGDPDVECRACDCDPRGIETPQCDQSTGQCVCVEGVEGPRCDKC
pCIS-LM $\beta 1$	NEFTGQCQCMPGFGGRTCSQCQELFWGDPDVECRACDCDPRGIETPQCDQSTGQCVCVEGVEGPRCDKC
$\beta 1$ teórica	TRGYSGVFPDCTPCHQCFALWDALIGELTNRTHKFLEKAKALKISGVIGPYRETVDVSVEKKVNEIKDIL
pCIS-LM $\beta 1$	TRGYSGVFPDCTPCHQCFALWDALIGELTNRTHKFLEKAKALKISGVIGPYRETVDVSVEKKVNEIKDIL
$\beta 1$ teórica	AQSPAAEPLKNI GILFEEAEKLTVDTEKMAQVEVKLTDTASQSNSTAGELGALQAEAESLDKTVKELA
pCIS-LM $\beta 1$	AQSPAAEPLKNI GILFEEAEKLTVDTEKMAQVEVKLTDTASQSNSTAGELGALQAEAESLDKTVKELA
$\beta 1$ teórica	EQLEFIKNSDIQGALDSITKYFQMSLEAEKRVNASTTDPNSTVEQSALTRDRVEDLMLERESPFKEQQE
pCIS-LM $\beta 1$	EQLEFIKNSDIQGALDSITKYFQMSLEAEKRVNASTTDPNSTVEQSALTRDRVEDLMLERESPFKEQQE
$\beta 1$ teórica	EQARLLDELAKLQSLDLSAAQMTCTGTPPGADCSESECGGPNCRTEGEKKCGGPGCGGLVTVHSAW
pCIS-LM $\beta 1$	EQARLLDELAKLQSLDLSAAQMTCTGTPPGADCSESECGGPNCRTEGEKKCGGPGCGGLVTVHSAW
$\beta 1$ teórica	QKAMDFDRDVL SALAEVEQLSKMVSEAKVRADEAKQNAQDVLLKT NATKEKVDKSNEDLRNLKQIRNF
pCIS-LM $\beta 1$	QKAMDFDRDVL SALAEVEQLSKMVSEAKVRADEAKQNAQDVLLKT NATKEKVDKSNEDLRNLKQIRNF
$\beta 1$ teórica	LTEDSADLDSIEAVANEVLKSGNASTPQQQLQNLTEDIRERVETLSQVEVILQQSAADIAAEALLLEAK
pCIS-LM $\beta 1$	LTEDSADLDSIEAVANEVLKMEMPTPQQQLQNLTEDIRERVETLSQVEVILQQSAADIAAEALLLEAK
$\beta 1$ teórica	RASKSATDVKVTADMVKEALEEAEKAQVAAEKAIKQADEDIQGTQNLTSIESETAASEETLTNASQRI
pCIS-LM $\beta 1$	RASKSATDVKVTADMVKEALEEAEKAQVAAEKAIKQADEDIQGTQNLTSIESETAASEETLTNASQRI
$\beta 1$ teórica	SKLERNVEELKRKAQNSGEAEYIEKVVSVKQNAQDDVKKTLDGELDEKYYKVESLIAQKTEESADARR
pCIS-LM $\beta 1$	SKLERNVEELKRKAQNSGEAEYIEKVVSVKQNAQDDVKKTLDGELDEKYYKVESLIAQKTEESADARR
$\beta 1$ teórica	KAELLQNEAKTLLAQANSKLQLLEDLERKYEDNQKYLEDKAQELVRLEGEVRSLLKDISKVAVYSTCL
pCIS-LM $\beta 1$	KAELLQNEAKTLLAQANSKLQLLEDLERKYEDNQKYLEDKAQELVRLEGEVRSLLKDISKVAVYSTCL

Figura 16. Alineamiento de la cadena  $\alpha 1$  teórica y de la cadena  $\alpha 1$  del plásmido pCIS-LM $\beta 1$ .

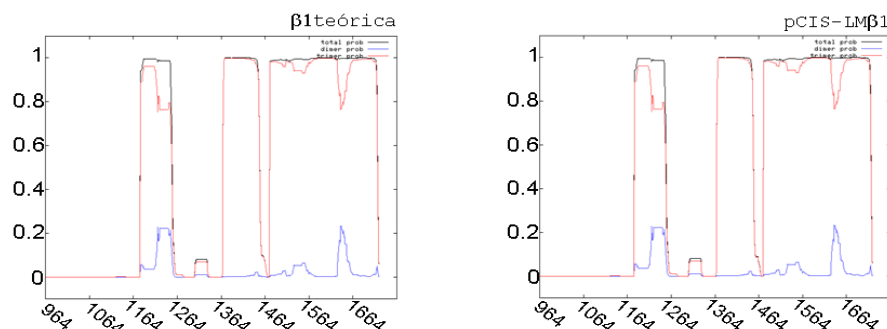


Figura 17. Predicciones realizadas con el programa Multicoil de la cadena  $\beta 1$  teórica y de la cadena  $\beta 1$  del plásmido pCIS-LM $\beta 1$ .

La secuenciación reveló la presencia de cuatro cambios en el dominio CCL1 $\beta$  con respecto a la secuencia teórica M. Sasaki (Figura 16). Tres cambios no conservativos S1470M, G1471E, y N1472M, y un cambio conservativo A1476P. Estos cambios de secuencia no son producto del proceso de amplificación del fragmento t $\beta 1$  ya que se trata de modificaciones descritas previamente (Barlow DP et al, 1984). Las predicciones



realizadas con el programa Multicoil indican que es poco probable que estos cambios puedan comprometer la estructura *coiled-coil* (Figura 17).

### 2.1.1. Construcción de vectores de expresión eucariota para la secreción de variantes truncadas de la cadena $\beta 1$ ( $t\beta 1$ )

Con el objetivo de estudiar los niveles de expresión y secreción de la  $t\beta 1$  en un sistema celular eucariótico se construyó el vector pSectag2Bt $\beta 1$ , que contiene la región codificante del dominio CCL1 $\beta$  completo y los módulos LE 11, 12 y 13 (aminoácidos

1017 a 1765) numeración según (Sasaki M et al, 1987) (Figura 18).

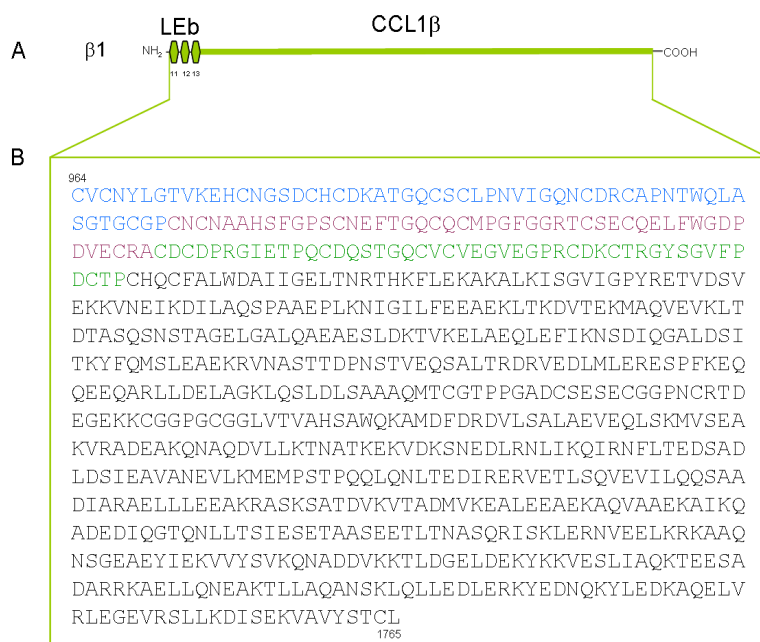


Figura 18: Representación esquemática y secuencia de aminoácidos de la cadena  $\beta 1$  truncada. En negro se representa la secuencia del dominio CCL1 $\beta$ , en azul, violeta y verde la secuencia de los módulos LE 11, 12 y 13 respectivamente.

El vector pSecTag2Bt $\beta 1$  incorpora en una única unidad transcripcional, bajo el control del promotor CMV, la región líder de la Ig $\kappa$  murina, la secuencia codificante de la  $t\beta 1$  y la secuencia codificante de las etiquetas peptídicas myc y polihistidina (Figura 19).

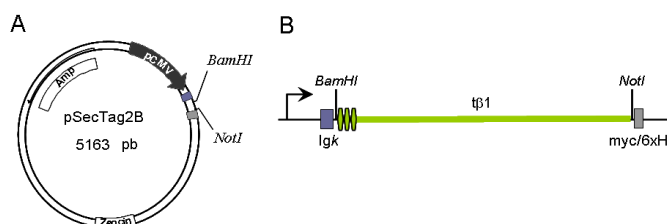


Figura 19. Representación esquemática del vector de expresión y de la construcción genética para la expresión en células eucarióticas de la cadena  $\beta 1$  truncada ( $t\beta 1$ ).

### 2.1.2. Producción y caracterización de la cadena $t\beta 1$

Células humanas HEK-293 se transfectaron con el vector pSecTag2Bt $\beta 1$ . A las 48 horas se determinó la eficiencia de transfección mediante CF y los niveles de secreción de la proteína  $t\beta 1$  mediante ELISA (Figura 20). En el medio condicionado de las células transfectadas con el plásmido pEGFPN1 no se detectó secreción de  $t\beta 1$ , mientras que en el medio condicionado de las células transfectadas con el plásmido pSecTag2Bt $\beta 1$  se detectó la presencia de  $t\beta 1$  (Figura 20B).

La caracterización estructural se realizó mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras. Como se observa en la Figura 19C la cadena  $t\beta 1^{myc}$  es secretada por las células HEK-293 y al igual que lo observado con la  $t\alpha 1$  (Figura 15) muestra un tamaño molecular ligeramente superior al estimado.

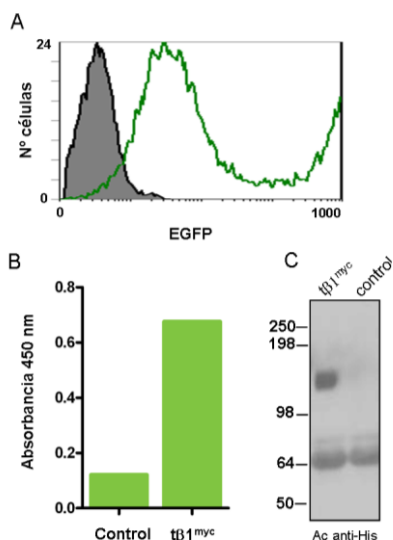


Figura 20. Análisis mediante CF de la expresión de EGFP en células HEK-293 no transfectadas (gris) o transfectadas con el vector pEGFPN1 (A). Análisis mediante ELISA (B) y mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras (C) de los medios condicionados obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el vector pEGFPN1 (control), o con el vector pSecTag2Bt $\beta 1$  ( $t\beta 1^{myc}$ ).

## 3. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES GÉNICAS QUE CODIFICAN VARIANTES TRUNCADAS DE LA CADENA $\gamma 1$

### 3.1. Diseño de construcciones génicas que comprende la región *coiled-coil* y dos dominos tipo laminina *EGF-like* de la cadena $\gamma 1$

Para el diseño de la cadena  $\gamma 1$  truncada ( $t\gamma 1$ ), carente de dominios globulares amino-terminales, nos basamos en la información disponible sobre las modificaciones proteolíticas del brazo corto de la cadena  $\gamma 2$  (Aumailley M et al, 2005), que mantiene algunos módulos

tipo LE. Por estos motivos en la  $\gamma 1$  decidimos incluir dos módulos LE, el dominio CCL1 $\gamma$  completo, una secuencia espaciadora (GGGGS) seguida de la etiqueta peptídico HA (YPYDVPDYA) y dos codones de parada (Figura 21).

### 3.1.1. Construcción de vectores de expresión eucariota para la secreción de variantes truncadas de la cadena $\gamma 1$ ( $\gamma 1$ )

Con el objetivo de estudiar los niveles de expresión y secreción de la cadena  $\gamma 1$  en un sistema celular eucariótico se construyeron los vectores pSecTag2B $\gamma 1^{HA}$ , pSecTag2B $\gamma 1$  y pCDNA3.1/Neo- $\gamma 1^{HA}$ . Para construir el vector pSecTag2B $\gamma 1^{HA}$  se construyó un gen sintético que codifica el dominio CCL1 $\gamma$  completo, los módulos LE 10 y 11 (aminoácido 956 y 1574) numeración según (Sasaki M et al, 1987), e incorpora un

espaciador flexible y una etiqueta peptídica. (Figura 21).

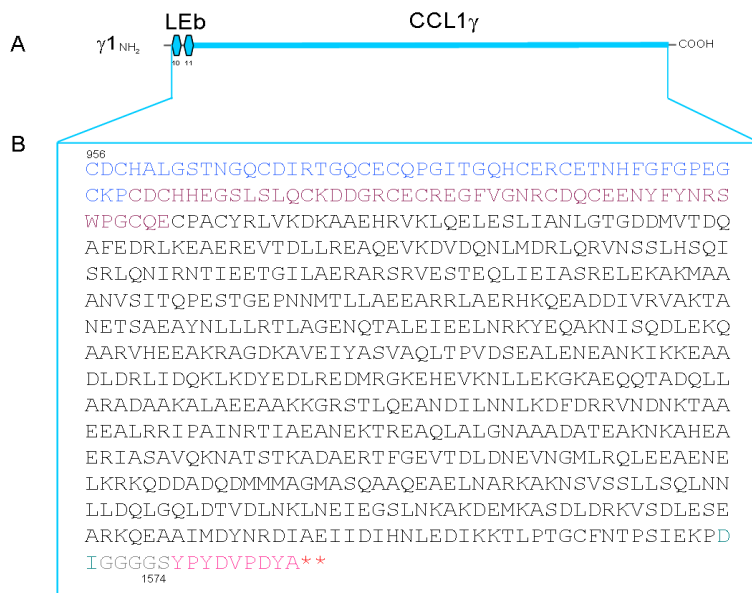


Figura 21. Representación esquemática y secuencia de aminoácidos de la cadena  $\gamma 1$  truncada. En negro se representa la secuencia del dominio CCL1 $\gamma$ , en azul y violeta la secuencia de los módulos LE 10 y 11 respectivamente. En gris se representa la secuencia espaciadora y en rosa la

secuencia de la etiqueta peptídico HA.

El vector pSecTag2B $\gamma 1^{HA}$  incorpora en una única unidad transcripcional, bajo el control del promotor CMV, la región líder de la Ig $\kappa$  murina, la secuencia codificante de la  $\gamma 1^{HA}$ . En este vector la secuencia codificante de las etiquetas peptídicas myc y 6His queda interrumpida por la presencia de dos codones de parada incorporados en el diseño de la construcción génica sintética. Para construir el plasmido pSecTag2B $\gamma 1$  el vector pSecTag2B $\gamma 1^{HA}$  se dirigió con EcoRV-NotI para insertar una pareja oligonucleótidos alineados (oligonucleótidos  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$ ) que contenían un sitio ClaI. Para

construir el plásmido pCDNA3.1/Neo-ty1<sup>HA</sup> el vector pSecTag2Bty1<sup>HA</sup> se dirigió con NdeI-NotI y el fragmento obtenido se clonó en el vector pCDNA3.1/Neo (Figura 22).

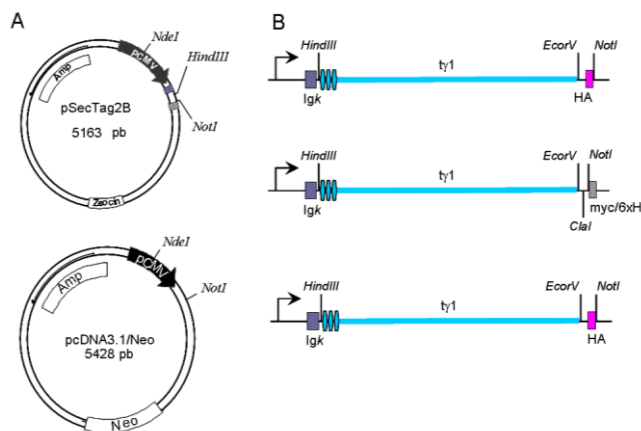
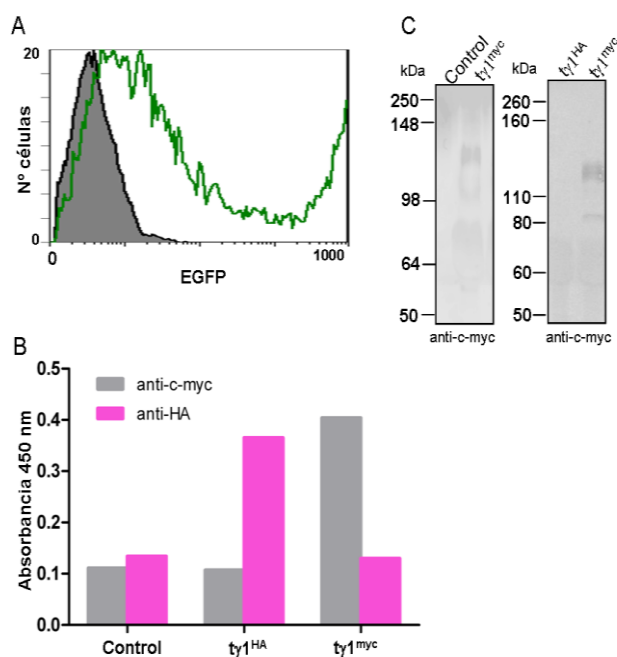


Figura 22. Representación esquemática de los vectores de expresión (A) y de las construcciones génicas (B) para la expresión en células eucarióticas de las cadenas γ1 truncadas (ty1).

### 3.1.2. Producción y caracterización de la cadena ty1

Los plásmidos pSecTag2Bty1 y pSecTag2Bty1<sup>HA</sup> se transfectaron en células HEK-293 humanas. A las 48 horas se determinó la eficiencia de transfección mediante CF y los niveles de secreción de la proteína ty1 mediante ELISA (Figura 23). En el medio condicionado de las células transfectadas con el plásmido pEGFPN1 no se detectó secreción de ty1, mientras que en el medio condicionado de las células transfectadas con los plásmidos pSecTag2Bty1 o pSecTag2Bty1<sup>HA</sup> se detectó la presencia de ty1 (Figura 23B). La caracterización estructural se analizó mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras. Como se observa en la Figura 23C la cadena ty1<sup>myc</sup> es secretada por las células HEK-293 y muestra un tamaño molecular ligeramente superior al estimado, mientras que no se detectó la cadena ty1<sup>HA</sup>.



superior al estimado, mientras que no se detectó la cadena ty1<sup>HA</sup>.

Figura 23. Análisis mediante CF de la expresión de EGFP en células HEK-293 no transfectadas (gris) o transfectadas con el vector pEGFN1 (A). Análisis mediante ELISA (B) y mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras (C) de los medios condicionados obtenidos de células HEK-293 transfectadas con el vector pEGFN1 (control), con el vector pSecTag2Bty1 (ty1<sup>myc</sup>), o con el vector pSecTag2Bty1<sup>HA</sup> (ty1<sup>myc</sup>).

## 4. PRODUCCION DE UN FRAGMENTO HETEROTRIMÉRICO $\alpha\beta\gamma$ TRUNCADO ( $\alpha\beta\gamma 1$ )

### 4.1. Generación de transfectantes transitorios en células 293F, con los vectores que codifican las cadenas $\alpha 1$ , $\beta 1$ y $\gamma 1$

Con el objetivo de generar un fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  truncado ( $\alpha\beta\gamma 1$ ), células 293F se cotransfectaron con los plásmidos que codificaban la cadena  $\alpha 1$  (pCDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ ),  $\beta 1$  (pSecTag2Bt $\beta 1$ ) y  $\gamma 1$  (pCDNA3.1/Neo- $\gamma 1^{\text{HA}}$ ). A las 48 horas se recogió el medio condicionado y se determinó el nivel de expresión de cada una de las cadenas truncadas individuales mediante ELISA (Figura 24A). En el medio condicionado de las células 293F no transfectadas no se detectó la secreción de  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  o  $\gamma 1$ , mientras que en el medio condicionado de células 293F cotransfectadas con los tres vectores se detectaron niveles apreciables de las tres cadenas truncadas. Como se observa en la Figura 24B las cadenas  $\beta 1$  y  $\alpha 1$  se secretaron de forma mas eficiente que la cadena  $\gamma 1$ . Al igual que lo observado en el sistema celular HEK-293 todas las cadenas truncadas mostraron un tamaño molecular ligeramente superior al estimado.

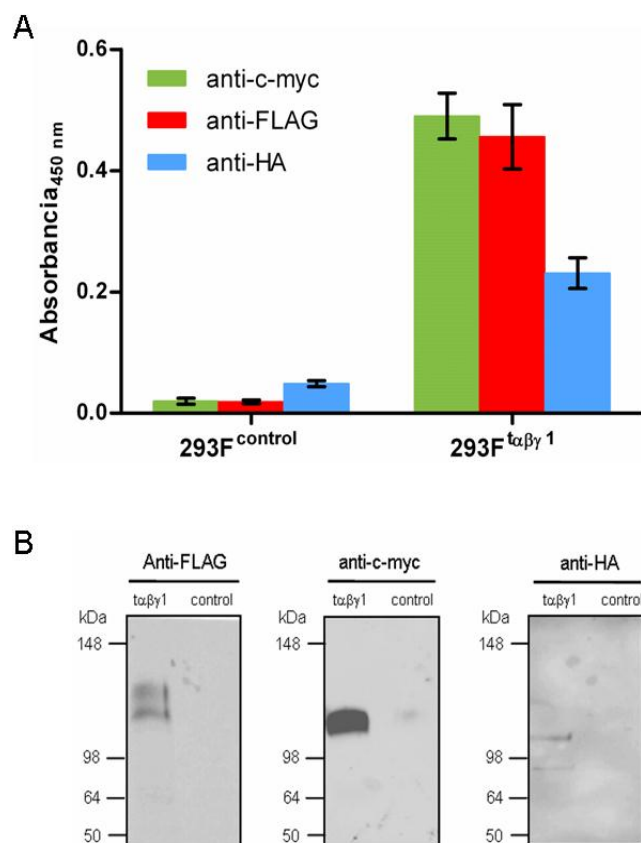


Figura 24. Análisis mediante ELISA (A) y mediante transferencia *Western* en condiciones reductoras (B) del medio condicionado obtenido de células 293F no transfectadas (control), o transfectadas con los vectores pCDNA3.1/Hygro $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ , pSecTag2Bt $\beta 1$  y pCDNA3.1/Neoty $\gamma 1^{\text{HA}}$ .

#### 4.2. Purificación del fragmento $\alpha\beta\gamma 1$

El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  se purificó a partir de medio condicionado obtenido de células 293F cotransfectadas con los plásmidos pCDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ , pSecTag2Bt $\beta 1$  y pCDNA3.1/Neo- $\gamma 1^{\text{HA}}$  (293F $^{\alpha\beta\gamma 1}$ ). El medio se recogió cada 72 horas durante un periodo de 10 días, periodo durante el cual se detectó la secreción de niveles significativos de cadena t $\beta 1$  (Figura 25).

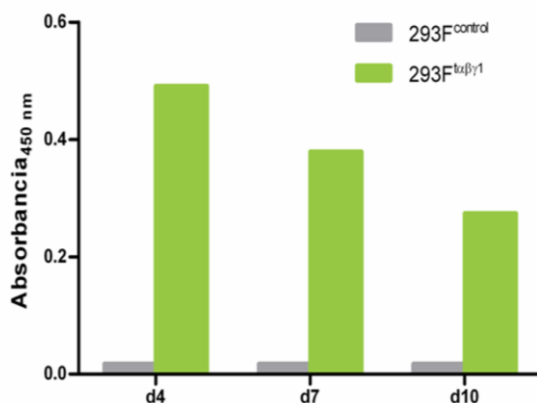


Figura 25. Análisis mediante ELISA con el AcMo anti-c-myc del medio condicionado obtenido cada 72 horas a partir de células 293F no transfectadas (293F<sup>control</sup>), o transfectadas con los vectores pCDNA3.1/Hygro  $\alpha 1^{\text{FLAG}}$ , pSecTag 2Bt $\beta 1$  y pCDNA3.1/Neoty1<sup>HA</sup> (293F $^{\alpha\beta\gamma 1}$ ).

El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  se purificó a partir de medio condicionado de células 293F $^{\alpha\beta\gamma 1}$  mediante una cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC), donde se observó un único pico muy homogéneo (Figura 26) que se analizó mediante SDS-PAGE y transferencia *Western* en condiciones reductoras. Como se observa en la Figura 26B, el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  presentaba un alto grado de pureza y dos bandas predominantes de 128 y 105 kDa. El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado era reconocido por los AcMos anti-FLAG, anti c-myc y anti-HA, con unos pesos moleculares aparentes de 120 kDa, 140 kDa y 112 kDa (83,9 kDa) para las cadenas  $\alpha 1$ , t $\beta 1$  y  $\gamma 1$  respectivamente.

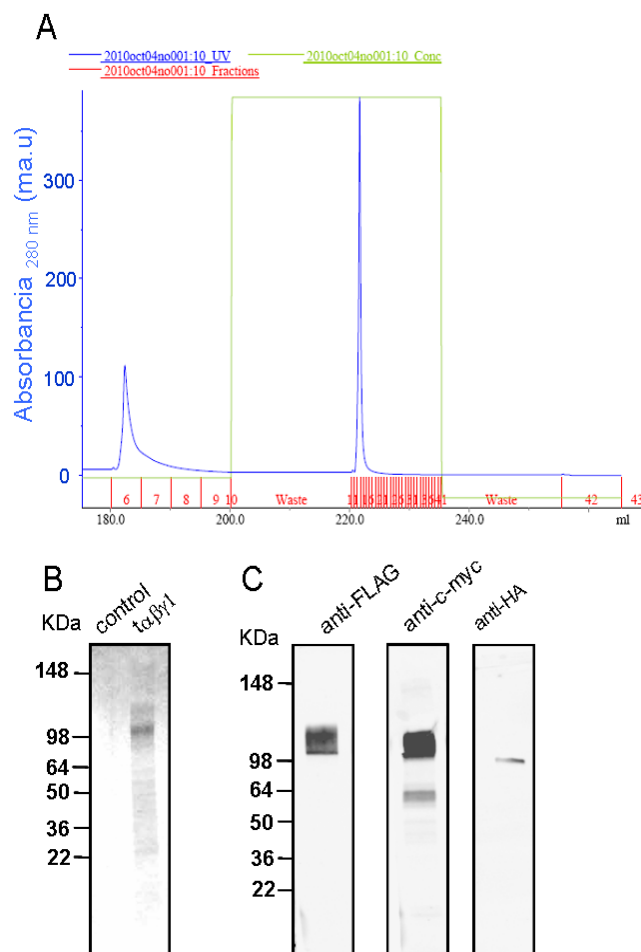


Figura 26. Pico de elución típico de una purificación mediante IMAC del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  (A) a partir de medio condicionado de células 293F transfectadas con los vectores pCDNA3.1/Hygro- $\alpha 1^{FLAG}$ , pSecTag2Bt $\beta 1$  y pCDNA3.1/Neoty1<sup>HA</sup> (293F <sup>$\alpha\beta\gamma 1$</sup> ). Tinción de Coomassie de la fracción de interés tras SDS-PAGE en condiciones reductoras (B). Transferencia Western de la fracción de interés en condiciones reductoras (C).

## 5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL E INMUNOLÓGICA DEL FRAGMENTO $\alpha\beta\gamma 1$ PURIFICADO

### 5.1. Estudios de desnaturalización térmica y dicróismo circular

Para conocer el grado de asociación entre las cadenas se realizaron curvas de dicróismo circular (DC) y curvas de desnaturalización térmica. El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado presenta dos mínimos a 209 nm y a 218 nm, y un máximo a 192 nm, un espectro muy similar al patrón típico de las estructuras helicoidales, lo que sugiere que el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  es un trímero posiblemente estructurado en hélice a modo de *coiled-coil* (Figura 27A). Observando la curva de desnaturalización por calor, el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  mostró un

## RESULTADOS

espectro de desnaturalización cooperativo, con un descenso en la elipticidad a 222 nm a una temperatura media de 58 °C, lo que indica que presenta una estructura terciaria bien definida y que las cadenas truncadas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  o  $\gamma 1$  se ensamblan como un *coiled-coil* heterotrimérico estable (Figura 27B).

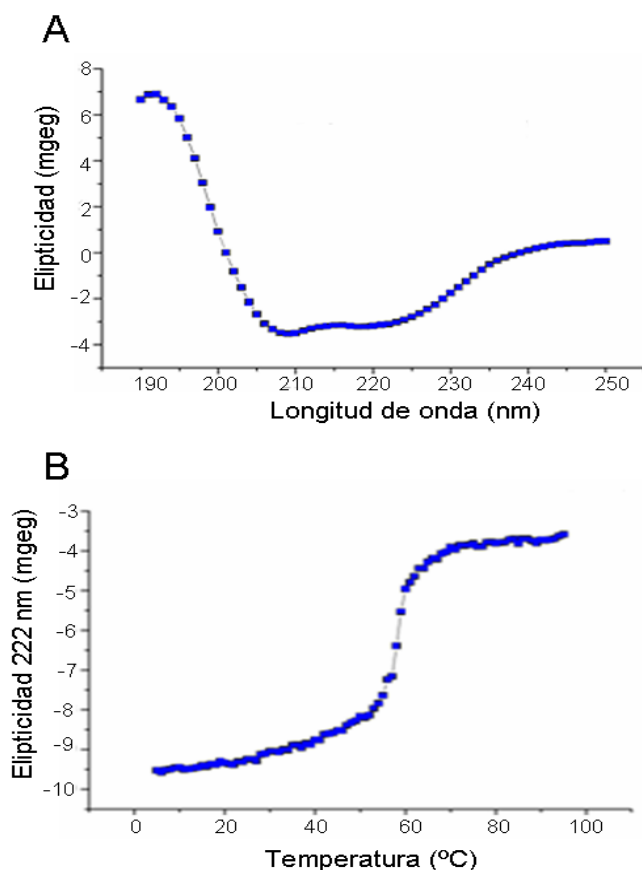


Figura 27. Análisis de la estructura heterotrimérica y del grado de asociación intercatenario mediante dicroísmo circular (A) y mediante desnaturalización térmica (B).

### 5.2. Análisis SEC-MALLs

La naturaleza oligomérica del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) utilizando detectores de dispersión de luz (MALLs). El fragmento heterotrimérico eluyó como un pico mayoritario con un tamaño estimado de 700 kDa, evaluación realizada a partir de los volúmenes de elución de los marcadores de peso molecular. Los picos de elución minoritarios corresponden con formas agregadas de laminina (Figura 28A). No obstante mediante el análisis MALLs se estimó un tamaño molecular de 335 kDa, lo que indica que la proteína purificada migra a través de la columna a mayor velocidad que las proteínas globulares de igual masa molecular (Figura 28B). Este comportamiento es típico de proteínas que no se encuentran ensambladas o que poseen una forma elongada. Como anteriormente comprobamos, mediante estudios de



DC, que la proteína se ensamblaba de manera estable, la movilidad electroforética anómala indica que se trata de una molécula elongada. No obstante el tamaño calculado sigue siendo superior al estimado para una proteína trimérica no glicosilada (253 kDa), lo que indica que los sitios de glicosilación de la molécula se encuentran en el dominio *coiled-coil* (Beck K et al, 1990).

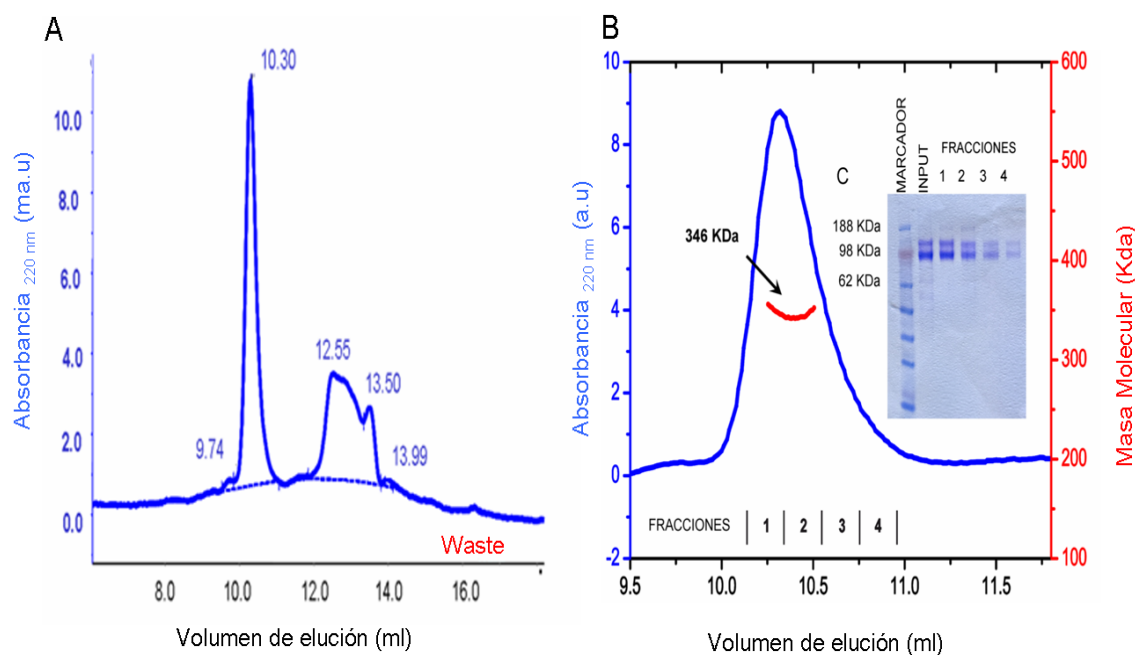


Figura 28. Cromatografía de exclusión combinado con un sistema de dispersión de luz (MALLS). Perfil de elución (A) y determinación de la masa molecular (B) del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$ . SDS-PAGE en condiciones reductoras del fragmento purificado, se observan dos bandas mayoritarias de tamaños 128 y 105 kDa (C).

### 5.3. Estudios Inmunológicos

Para confirmar la integridad inmunológica del fragmento purificado se diseñaron varios ensayos de ELISA, inmovilizando el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  o LM-111 nativa. Como se observa en la Figura 29, el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$ , al igual que la LM-111 es reconocido de forma específica por un anticuerpo policlonal anti-LM-111 (Figura 29A). Es importante destacar que el anticuerpo L36 en formato scFv reconoce tanto la LM nativa como el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$ , mientras que un anticuerpo control (clon 2.15) también en formato scFv, no interacciona con ninguna de las proteínas inmovilizadas. El anticuerpo L36, reconoce un epítipo conformacional, formado por residuos de las cadena  $\alpha 1$  y  $\gamma 1$ , localizado en la parte media del brazo largo de la LM-111 (Sanz L et al, 2003c) (Figura 9).

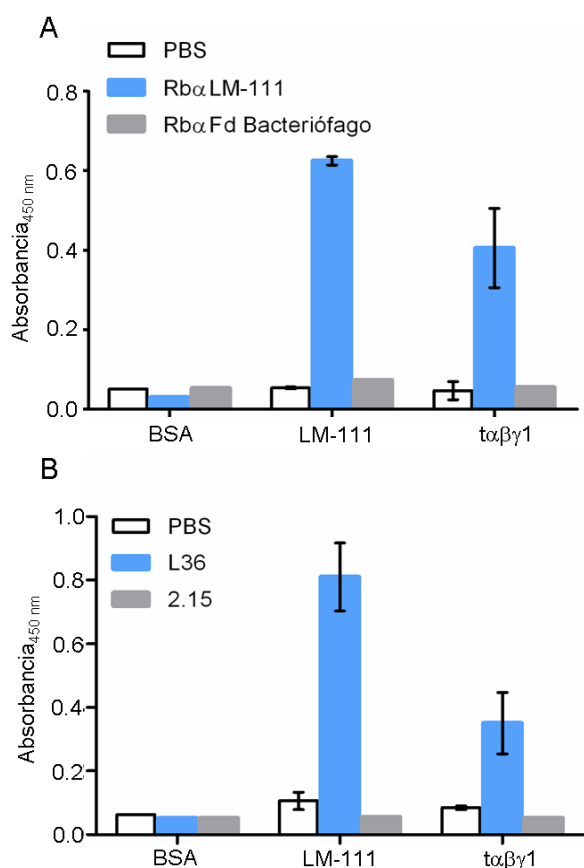


Figura 29. Determinación mediante ELISA, de la interacción del fragmento tαβγ1 y de la LM-111 nativa con anticuerpos policlonales (A), y anticuerpos en formato scFv (B).

Para confirmar la presencia de al menos dos cadenas truncadas en la misma molécula del fragmento tαβγ1 purificado se diseñaron varios ensayos ELISA en los que el fragmento tαβγ1 se añadió sobre placas tapizadas con un AcMo anti-HA (cadena tγ1) o un AcMo anti-FLAG (cadena tα1), y tras varios lavados, se incubó con un AcMo anti-His conjugado con biotina (cadena tβ1). Como se observa en la Figura 30 en

ambos casos se observa señal específica con el fragmento tαβγ1 purificado, pero no con la LM-111.

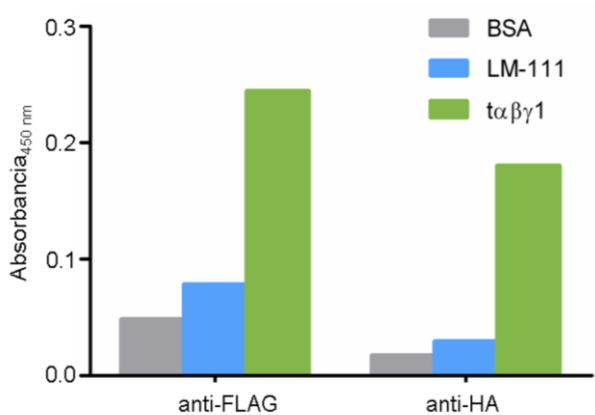


Figura 30. ELISA para estudiar la presencia de varias cadena en la misma molécula del fragmento tαβγ1. Tras la interacción del fragmento purificado con el AcMo de captura anti-FLA (tγ1) o anti-HA (tα1), este se detectó con un AcMo anti-His (tβ1) biotinilado.

## 6. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL FRAGMENTO tαβγ1 PURIFICADO

La influencia de la LM-111 y de algunos fragmentos derivados de la misma (fragmentos proteolíticos y fragmentos recombinantes) sobre diversos procesos celulares (adhesión, proliferación, diferenciación y migración celular) está bien documentada (Kleinman HK et

al, 1985; Jones JC et al, 2000). Inicialmente en este trabajo estudiamos la capacidad del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado para interactuar con receptores de membrana celular. Como se observa en la Figura 31, el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  se une de forma dosis-dependiente a receptores de membrana expresados en la superficie de las células HT1080.

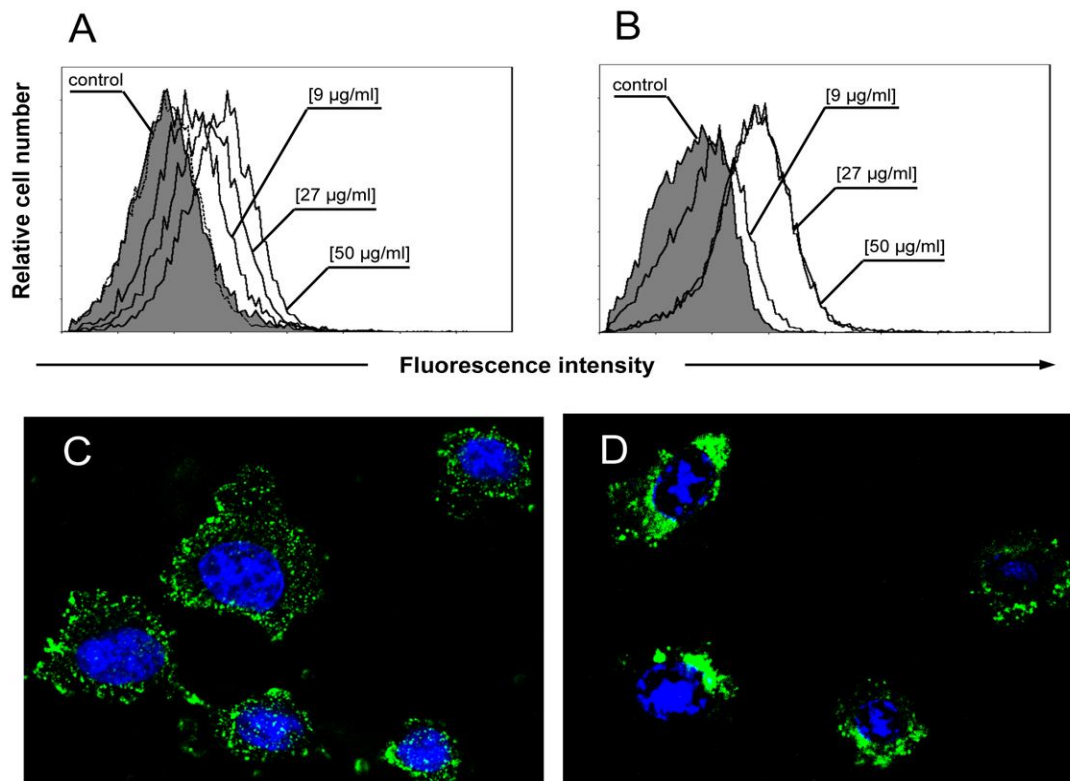


Figura 31. Estudio por citometría de flujo de la interacción entre la LM-111 nativa (A) o el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado (B) con receptores de membrana en células HT1080. El control isotópico aparece en gris. Imágenes de microscopía confocal en células HT1080 no fijadas tratadas con LM-111 nativa (C) o el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado (D).

### 6.1. Efecto sobre la adhesión celular

Para estudiar el efecto sobre la adhesión celular se procedió a realizar ensayos sobre placas de cultivo con diferentes concentraciones de LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizados. Las células HT1080 se adhieren a la LM-111 de forma dependiente de dosis, mientras que el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado no solo no promueve la adhesión celular sino que muestra un claro efecto anti-adhesivo (Figura 32A). Es importante destacar que a las concentraciones más elevadas (2,3 a 21  $\mu\text{g/ml}$ ) las diferencias con respecto al control (BSA) fueron estadísticamente significativas en ambos casos (LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$ ). Como se puede observar en la Figura 32B el efecto anti-adhesivo del  $\alpha\beta\gamma 1$  no es debido a una ineficiente inmovilización del fragmento purificado sobre la superficie de la placa de cultivo.

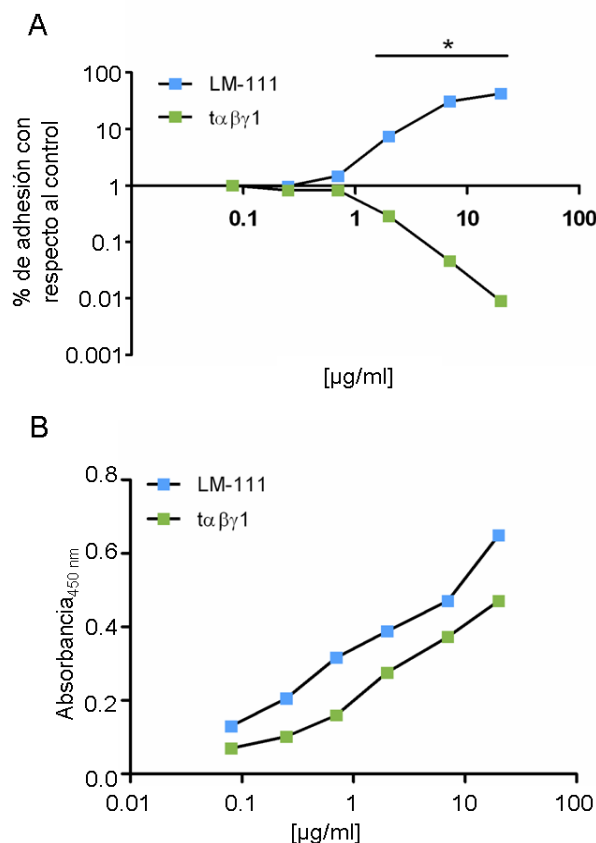


Figura 32. El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado ejerce un efecto anti-adhesivo sobre células HT1080. Estudio comparativo de la adhesión sobre placas de cultivo tapizadas con diferentes concentraciones (0,08 a 20 μg/ml) de LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado (A). La eficiencia de proceso de inmovilización se determinó mediante ELISA con un anticuerpo policlonal anti-LM-111 (B). Los datos son de un experimento representativo de tres experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ).

Para determinar si el efecto anti-adhesivo del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado era dependiente del tipo celular, se realizaron ensayos de adhesión con células humanas primarias: células endoteliales derivadas de la vena umbilical (HUVEC) y pericitos de micro-vasculatura de cerebro (HBVP). Como se observa en la Figura 33 ambos tipos celulares se adhieren de forma eficiente a la LM-111, mientras que el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado muestra un claro efecto anti-adhesivo.

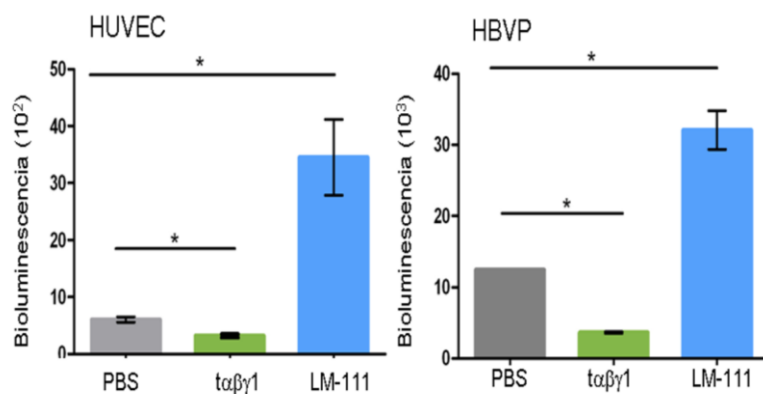


Figura 33. El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado ejerce un efecto anti-adhesivo sobre células primarias: HUVEC y HBVP. Los datos son de un experimento representativo de tres experimentos independientes. (\*  $p < 0,05$ ).

Posteriormente se determinó el efecto del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  en solución sobre la adhesión de células HT1080 y células HUVEC a placas de cultivo tapizadas con LM-111. Como se observa en la Figura 34 la adición de 20  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha\beta\gamma 1$  reduce en un 50% la adhesión a LM-111 de ambos tipos celulares, mientras que la adición de 20  $\mu\text{g/ml}$  BSA no tiene efecto sobre la adhesión en ninguno de los tipos celulares estudiados. La inhibición de la adhesión a LM-111 inmovilizada mediada por  $\alpha\beta\gamma 1$  ocurre de manera dependiente de concentración.

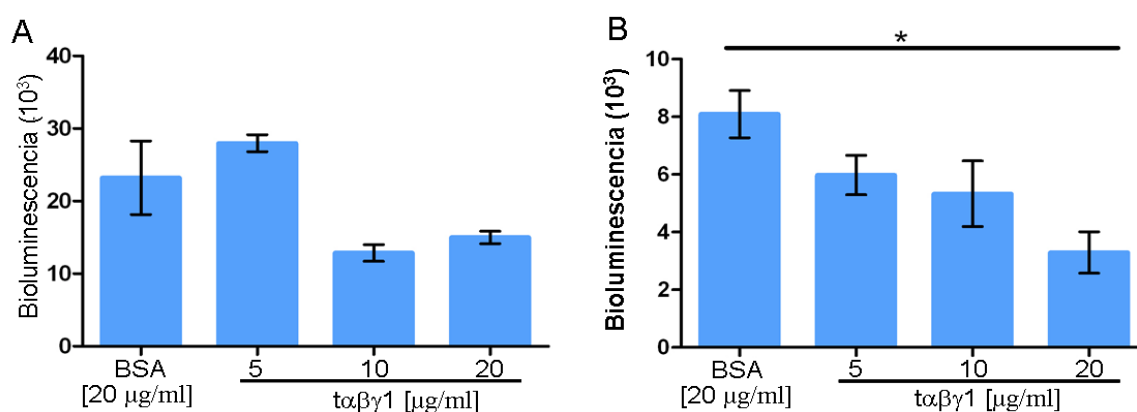


Figura 34. El fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  en solución inhibe la adhesión de células HT1080 (A) y células HUVEC (B) a LM-111 inmovilizada.

## 6.2. Efecto sobre la reorganización del citoesqueleto de actina

Para estudiar el efecto del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado sobre el citoesqueleto de actina, se cultivaron células HT1080 en placas en las que se había inmovilizado BSA, LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$ . A las 6 horas, los filamentos de actina se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa Fluor 594 y se analizaron mediante microscopía confocal (Figura 35). Las células cultivadas sobre LM-111 presentaban fibras de *stress* prominentes que atravesaban todo el cuerpo celular, mientras que las células incubadas sobre el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  apenas presentaban fibras de *stress*. En estas células se produjo una reorganización peculiar del citoesqueleto de actina, con la tinción de faloidina localizada principalmente en la periferia, donde se observan numerosos *ruffles* que dan a la membrana un aspecto “erizado” y estructuras a modo de parche (*patch-like structure*).

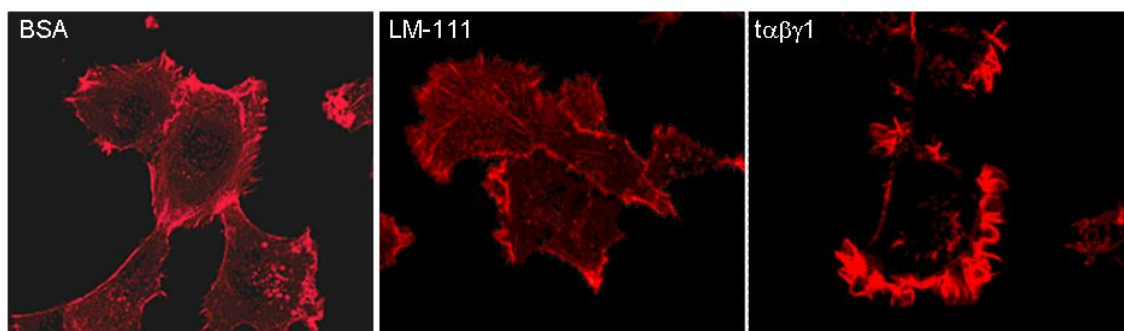


Figura 35. Visualización de citoesqueleto de actina en células HT1080 tras un periodo de cultivo de 6 horas en presencia de BSA, LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

### 6.3. Efecto sobre la morfología celular

Con el objetivo de estudiar el efecto del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  sobre la morfología celular, células HT1080 se cultivaron sobre placas tapizadas con BSA, LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$ , y a diferentes tiempos se determinó el porcentaje de células que presentaban una morfología redondeada. Como se observa en la Figura 36 las células cultivadas sobre LM-111 inmovilizada experimentan un cambio morfológico conocido como *spreading*, durante el cual se generan proyecciones de membrana denominadas filipodios y lamelipodios. Por el contrario, las células cultivadas sobre  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado mantienen una morfología redondeada durante periodo prolongados, e incluso tras 5 horas de cultivo el porcentaje de células con prolongaciones de membrana (*spreading*) es menor respecto a las células cultivadas sobre LM-111. En un estudio equivalente realizado con células HUVEC se obtuvieron resultados similares (Figura 36B).

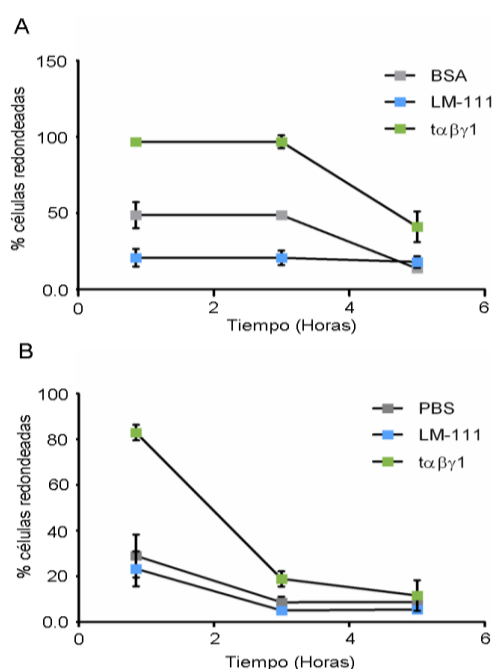


Figura 36. Porcentaje de células HT1080 (A) o células HUVEC (B) con morfología redondeada cultivadas en placas tapizadas con BSA, LM-111, o  $\alpha\beta\gamma 1$ . Se consideraron células en *spreading* aquellas células con prolongaciones de membrana visibles mientras que las células redondeadas se definieron como aquellas células con prolongaciones de membrana pequeñas o inexistentes.

### 6.4. Efecto sobre la proliferación celular

El siguiente objetivo consistió en analizar si la incubación sobre el fragmento  $\alpha\gamma\beta 1$  purificado tenía algún efecto sobre la proliferación celular. Para ello las células HT1080 se cultivaron durante 96 horas sobre pocillos tapizados con BSA, LM-111, o  $\alpha\gamma\beta 1$ . A diferentes tiempos se cuantificó la cantidad de ATP (y de forma indirecta, el número de células) presente en cada pocillo usando un ensayo de base bioluminiscente, y los datos correspondientes a LM-111 y  $\alpha\gamma\beta 1$  se representaron como porcentaje respecto al control (BSA). Como se observa en la Figura 37A a las 48 horas no se observaron diferencias significativas en la capacidad proliferativa de las células cultivadas sobre LM-111 o sobre  $\alpha\gamma\beta 1$ , respecto al control. Sin embargo, a las 96 horas se evidenció una disminución en la proliferación sobre ambos sustratos, que era más acusada en el caso del  $\alpha\gamma\beta 1$  purificado.

Para comprobar si este efecto tenía alguna repercusión sobre el ciclo celular, se estudió el contenido de ADN mediante citometría de flujo (Figura 37B). A las 48 horas no se evidenciaron diferencias significativas entre las células cultivadas sobre BSA, LM-111 o  $\alpha\gamma\beta 1$ . Sin embargo, a las 96 horas, se observó una acumulación de células en la fase G2/M en la población cultivada sobre  $\alpha\gamma\beta 1$  (2,3 veces con respecto al control de BSA).

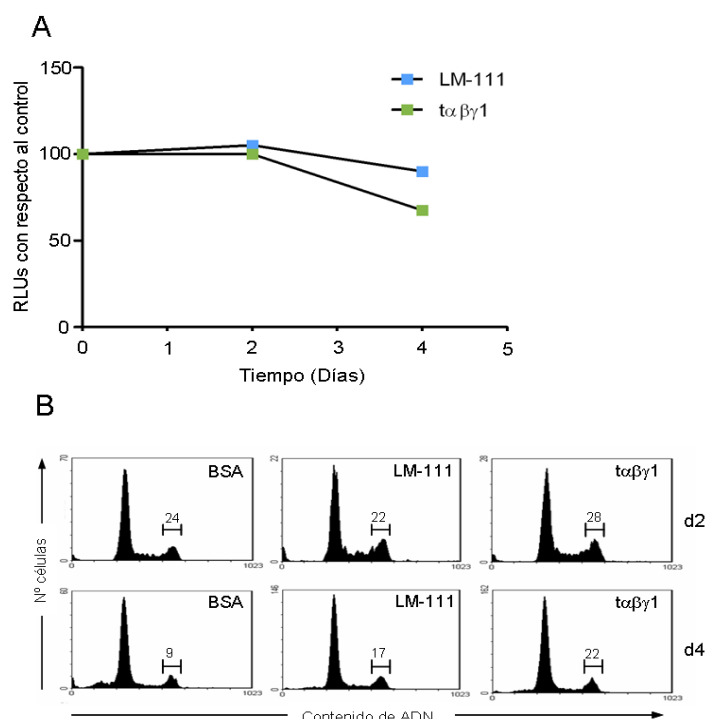


Figura 37. Estudio de proliferación (A) y ciclo celular (B) de células HT1080 cultivadas durante el periodo de tiempo indicados sobre placas tapizadas con BSA, LM-111, o  $\alpha\gamma\beta 1$ .

## 7. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN CÉLULAS CULTIVADAS SOBRE EL FRAGMENTO $\alpha\beta\gamma 1$ PURIFICADO

### 7.1. *Microarrays* de ADN

Para estudiar el efecto del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado sobre el perfil transcripcional de las células HT1080 se utilizó el *microarray* de DNA *GeneChip® Human Gene 1.0 ST*. Este array que permite identificar 19.734 genes cuya secuencia completa se encuentra depositada en las bases de datos GenBank y RefSeq se utilizó para comparar el nivel relativo de expresión génica en células HT1080 cultivadas durante 24 horas sobre placas tapizadas con BSA o  $\alpha\beta\gamma 1$ . Se identificaron 62 genes cuya expresión era modulada al menos dos veces en relación con el control (BSA), en 45 genes se incrementaban su expresión y en 17 genes disminuía en presencia del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado (Tabla X).

Para la anotación funcional de estos genes se usó el modelo de ontología génica (GO, del inglés, *gene ontology*) (Ashburner M, 2000) organizada en tres categorías: proceso biológico (BP, del inglés *biological process*), función molecular (MF, del inglés *molecular function*) y compartimento celular (CC, del inglés, *cellular component*). La asignación de GO se realizó mediante el programa DAVID, así como el análisis de enriquecimiento funcional de términos GO sobre-representados (Tabla XI). La significación estadística de dicho análisis se calculó con una modificación del test exacto de Fisher. Los valores de  $p$  obtenidos se corrigieron con diferentes estadísticos cada vez más restrictivos para minimizar la proporción de falsos positivos. Dentro de la categoría MF, el término matriz extracelular fue el que alcanzó mayor significación estadística (FDR=9,4134E-5). En la categoría de BP, fueron dos los términos enriquecidos significativamente: señalización mediada por ligando y comunicación celular (FDR=0,0279 y 0,0333, respectivamente). Los genes incluidos en cada una de estas categorías se enumeran en la Tabla XII.



<i>Nombre del gen (Símbolo)</i>	<i>Número de acceso</i>	<i>Incremento</i>
Amelotin (AMTN)	NM_212557	10,162
ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 2 (ST6GAL2),	NM_032528	4,344
ATPase, H <sup>+</sup> transporting, lysosomal 38kDa, V0 subunit d2 (ATP6V0D2)	NM_152565	4,006
Versican (VCAN)	NM_004385	3,863
Matrix Gla protein (MGP)	NM_000900	3,551
Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2)	NM_005651	3,363
Glycoprotein (transmembrane) nmb (GPNMB)	NM_001005340	3,261
Plexin domain containing 2 (PLXDC2)	NM_032812	3,186
Prostate transmembrane protein, androgen induced 1 (PMEPA1)	NM_020182	3,115
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 (TNFAIP6)	NM_007115	3,089
Taste receptor, type 2, member 4 (TAS2R4)	NM_016944	2,892
Ovarian cancer-related protein 1 (OCR1)	AF314543	2,698
Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 12 (SLC2A12)	NM_145176	2,644
Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9 (NEDD9)	NM_001142393	2,634
G protein-coupled receptor 21 (GPR21)	NM_005294	2,593
MicroRNA pri-miR-21, complete sequence	AY699265	2,549
Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB)	NM_002609	2,540
Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) (MMP2)	NM_004530	2,518
T-complex 11 (mouse)-like 2 (TCP11L2)	NM_152772	2,454
Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) (MMP13)	NM_002427	2,395
BH3-like motif containing, cell death inducer (BLID)	NM_001001786	2,384
Wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A)	NM_003392	2,365
Fibrillin 1 (FBN1)	NM_000138	2,349
Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1)	BC018448	2,341
EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 (EDIL3)	NM_005711	2,298
Secreted phosphoprotein 1 (SPP1)	NM_001040058	2,284
Mannosidase, beta A, lysosomal (MANBA)	NM_005908	2,277
KIAA1199	NM_018689	2,264
Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1 (LRRFIP1)	NM_001137550	2,245
Taste receptor, type 2, member 3 (TAS2R3)	NM_016943	2,204
Olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 16 (OR4F16)	NM_001005277	2,203
Transducer of ERBB2, 2 (TOB2)	BC028919	2,193

## RESULTADOS

SLIT and NTRK-like family, member 6 (SLITRK6)	NM_032229	2,165
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 (ABCA1)	NM_005502	2,163
Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15 (KCNJ15)	NM_002243	2,161
HtrA serine peptidase 1 (HTRA1)	NM_002775	2,134
Solute carrier family 16, member 4 (monocarboxylic acid transporter 5) (SLC16A4)	NM_004696	2,083
POTE ankyrin domain family, member C (POTEC)	NM_001137671	2,077
POTE ankyrin domain family, member B (POTEB)	NM_207355	2,066
glypican 6 (GPC6)	NM_005708	2,065
Unc-5 homolog B (Celegans) (UNC5B)	NM_170744	2,054
ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3 (ABCC3)	NM_003786	2,029
HAWMS1 (TRA2A)	AB052759	2,025
Solute carrier family 1 (glial glutamate transporter), member 3 (SLC1A3)	NM_004172	2,013
Small nucleolar RNA, H/ACA box 75 (SNORA75), non-coding RNA	NR_002921	2,011
Fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1)	NM_000800	0,487
Urothelial cancer associated 1 (UCA1), non-coding RNA	NR_015379	0,487
Membrane protein, palmitoylated 4 (MAGUK p55 subfamily member 4) (MPP4)	NM_033066	0,486
ChaC, cation transport regulator homolog 1 (Ecoli) (CHAC1)	NM_024111	0,468
Lymphocyte antigen 6 complex, locus K (LY6K)	NM_017527	0,433
Collagen and calcium binding EGF domains 1 (CCBE1)	NM_133459	0,432
Transmembrane protein 71 (TMEM71)	NM_144649	0,424
Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1)	NM_057159	0,420
Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6 (GABRA6)	NM_000811	0,411
Small nucleolar RNA, C/D box 41 (SNORD41), non-coding RNA	NR_002751	0,406
Aldehyde oxidase 1 (AOX1)	NM_001159	0,406
Interleukin 8 (IL8)	NM_000584	0,386
CD22 molecule (CD22)	NM_001771	0,381
MAS-related GPR, member X4 (MRGPRX4)	NM_054032	0,359
Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 7 (SERPINB7)	NM_003784	0,323
Endothelial cell-specific molecule 1 (ESM1)	NM_007036	0,268
Interleukin 24 (IL24)	NM_006850	0,159

Tabla X. Genes modulados en células HT1080 cultivadas en presencia de  $\alpha\beta\gamma 1$  purificado.

Tabla XI. Anotación funcional de los genes modulados.

<i>Categoría</i>	<i>Término</i>	<i>Nº genes/Lista</i>	<i>“Pop Hits”/Total</i>	<i>Enriquecimiento</i>	<i>Valor P</i>	<i>Bonferroni</i>	<i>Benjamini</i>	<i>FDR</i>
PANTHER_BP_ALL	BP00122: Señalización mediada por ligando.	9/42	386/12713	7,0575	2,6658E-5	0,0020	0,0020	<b>0,0279</b>
	BP00274: Comunicación celular.	14/42	1125/12713	3,7668	3,1856E-5	0,0024	0,0012	<b>0,0333</b>
	BP00223: Angiogénesis	3/42	52/12713	17,4629	0,0122	0,5954	0,2604	12,0129
	BP00102: Transducción de señal.	18/42	3207/12713	1,6989	0,0165	0,7079	0,2648	15,9765
	BP00141: Transporte	9/42	1210/12713	2,2514	0,0369	0,9382	0,4269	32,5478
PANTHER_MF_ALL	MF00178: Matriz extracelular	11/42	352/13084	9,7351	9,3281E-8	5,7834E-6	5,7834E-6	<b>9,4134E-5</b>
	MF00181: Otros genes de matriz extracelular.	4/42	36/13084	34,6138	1,8978E-4	0,0117	0,0058	0,1914
	MF00179: Proteínas estructurales de matriz extracelular.	4/42	82/13084	15,1963	0,0021	0,1239	0,0431	2,1290
	MF00016: Moléculas de señalización.	8/42	741/13084	3,3633	0,0076	0,3754	0,1110	7,3744
	MF00082: Transportadores	7/42	613/13084	3,5574	0,0115	0,5107	0,1332	10,9841
	MF00180: Glicoproteínas de matriz extracelular.	3/42	94/13084	9,9422	0,0349	0,8897	0,3075	30,1486

## RESULTADOS

Tabla XII. Genes comprendidos en los términos más relevantes de la Tabla XI.

<i>Termino</i>	<i>Nombre del gen (Símbolo)</i>
<i>Señalización mediada por ligando</i>	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 (EDIL3) Fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1) Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6 (GABRA6) Interleukin 8 (IL8) Interleukin 24 (IL24) Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1) Matrix Gla protein (MGP) Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 (SLC1A3) Wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A)
<i>Comunicación celular</i>	CD22 molecule (CD22) EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 (EDIL3) HtrA serine peptidase 1 (HTRA1) Fibrillin 1 (FBN1) Fibroblast growth factor 1 (acidic) (FGF1) Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6 (GABRA6) Interleukin 8 (IL8) Interleukin 24 (IL24) Lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1) Matrix Gla protein (MGP) Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 (SLC1A3) Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 (TNFAIP6) Versican (VCAN) Wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A)
<i>Matriz extracelular</i>	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3 (EDIL3) SLIT and NTRK-like family, member 6 (SLITRK6) Collagen and calcium binding EGF domains 1 (CCBE1) Fibrillin 1 (FBN1) Glypican 6 (GPC6) Matrix Gla protein (MGP) Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) (MMP2) Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) (MMP13) Secreted phosphoprotein 1 (SPP1) Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 (TNFAIP6) Versican (VCAN)

## 7.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Con el objeto de validar los resultados obtenidos con los *microarrays* se seleccionaron 10 genes para su análisis mediante qRT-PCR en las muestras de RNA originales de las células HT1080. De los 10 genes seleccionados, 9 genes aumentaban su expresión (VCAN, MGP, GPNMB, MMP2, MMP13, BLID, WNT5A, OCR1y SSP1) y 1 gen disminuía su expresión (IL-24) tras el cultivo sobre  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado, de acuerdo con los datos de los *microarrays*. Según los criterios propuestos por Rajeevan et al, (Rajeevan MS et al, 2001), la modulación de la expresión de un gen en una determinada condición experimental queda validada cuando por ambas técnicas (*microarrays* y qRT-PCR) presenta un valor mayor o igual a 2, en un sentido o en otro. Este criterio se cumple en todos los genes analizados excepto en el caso de OCR1, cuya expresión se incrementa con respecto al control por qRT-PCR pero no alcanza dicho valor umbral. De hecho, en 8 de los genes estudiados el incremento en la expresión es mayor cuando se analiza por qRT-PCR, de acuerdo con la observación de que los *microarrays* tienden a subestimar la magnitud de la modulación de la expresión génica (Figura 38).

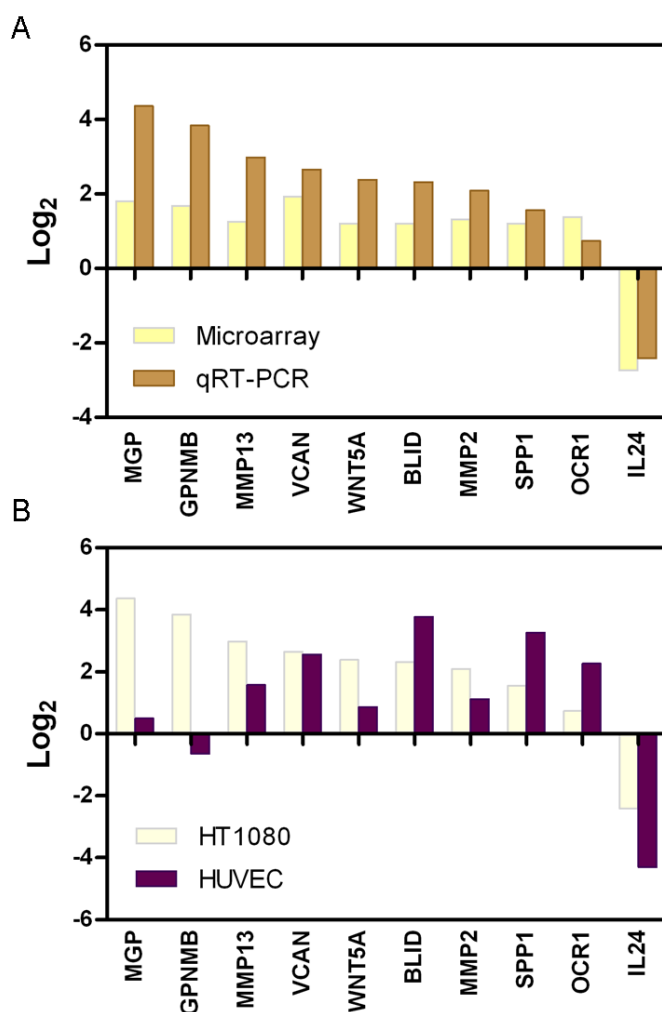


Figura 38. Validación de los resultados de los *microarrays* mediante análisis por qRT-PCR de la expresión de 10 genes relevantes modulados en células HT1080 (A). Análisis comparativo por qRT-PCR de la modulación de estos 10 genes en células HT1080 y HUVEC (B).

Para comprobar si los cambios en la expresión de estos genes podían ser reproducidos en células humanas primarias, el ensayo se repitió en células HUVEC. Excepto en el caso de los genes MGP y GPNMB, más relacionados tal vez con el contexto tumoral, las tendencias de los cambios de expresión se reprodujeron en HUVEC (Figura 38B). El incremento en la expresión de los genes MMP2, MMP13 y WNT5A fue algo menor en HUVEC, mientras que la expresión de los genes SPP1, OCR1, BLID e IL24 se moduló de forma más acusada en células HUVEC que en células HT1080. Estos resultados sugieren que la interacción con el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  podría inducir un fenotipo más invasivo tanto en líneas tumorales como en células primarias humanas

### 7.3. Zimografía

Para comprobar si la regulación transcripcional del gen MMP-2 en presencia del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado se correspondía con un incremento en el nivel de proteína, se realizaron estudios de zimografía con el medio condicionado de células HT1080 cultivadas durante 24, 48 o 72 horas sobre placas tapizadas con BSA, LM-111 o  $\alpha\beta\gamma 1$  (Figura 39A). En el zimograma se puede observar que las células HT1080 producen de manera constitutiva MMP-9 (92 kDa) y pro-MMP-2 (70-72 kDa). Al cultivar las células en presencia del fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado la expresión de MMP-9 no se modifica, pero aumenta la expresión de pro-MMP-2. Este fenómeno no se reproduce cuando las células se cultivaron sobre LM-111 nativa inmovilizada. Es más, en el sobrenadante de las células cultivadas sobre  $\alpha\beta\gamma 1$  no solo se aprecia un incremento de la pro-MMP-2 sino también de su forma activa, de menor peso molecular (62-65kDa). Para una evaluación mas precisa se llevó a cabo una valoración densitométrica de cada una de las MMP empleando el programa pCBAS (Figura 39).

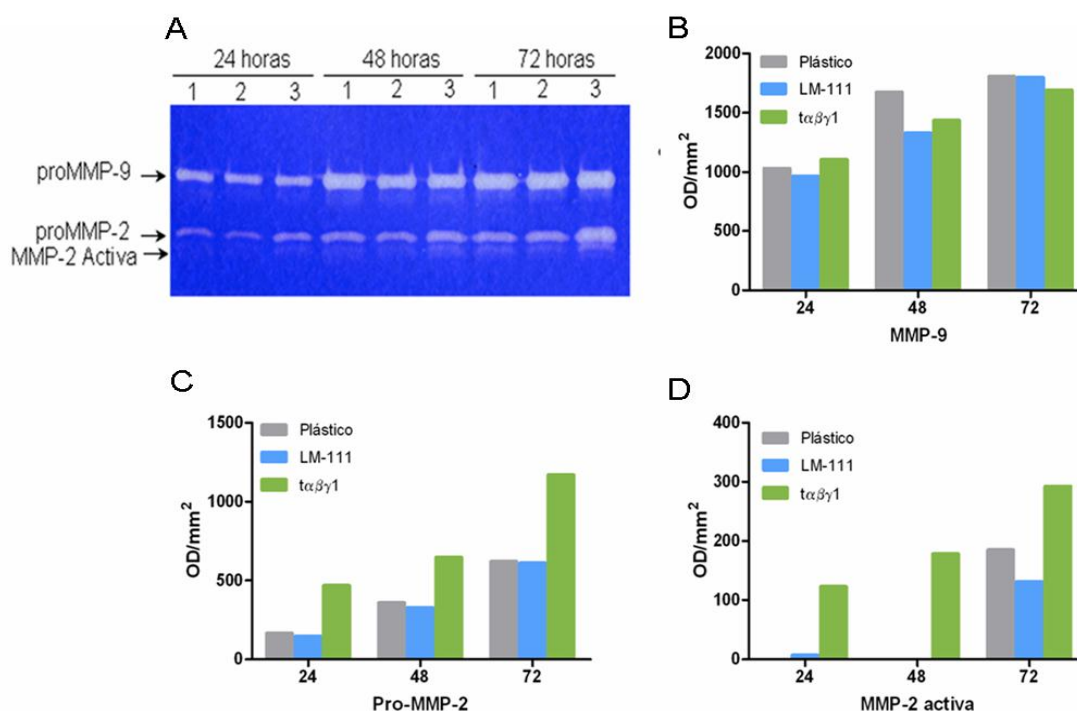


Figura 39. (A) Zimograma de medio condicionado de células HT1080 cultivadas durante 24, 48 y 72 horas sobre placas tapizadas con BSA (1), LM-111 (2) o  $\alpha\beta\gamma 1$  (3). Cuantificación densitométrica de MMP-9 (B), pro-MMP-2 (C) y MMP-2 activa (D).

#### 7.4. Estudios de migración e invasión celular

El patrón transcripcional inducido por el fragmento  $\alpha\beta\gamma 1$ , así como el aumento en la producción de MMP-2, sugieren un fenotipo pro-migratorio. Para estudiar su efecto sobre la migración celular, células HT1080 cultivadas durante 48 horas sobre placas tapizadas con BSA o  $\alpha\beta\gamma 1$  se añadieron a la parte superior de una cámara Boyden modificada. Al cabo de 3 horas se eliminaron las células que no habían migrado y se cuantificaron las que habían pasado a la parte inferior. Se observó un ligero aumento (no significativo) en la capacidad migratoria de las células HT1080 preincubadas con el  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado (Figura 40A). La capacidad invasiva de las células HT1080 cultivadas durante 48 horas sobre placas tapizadas con BSA o  $\alpha\beta\gamma 1$  se estudió en un ensayo similar, en el que el filtro que separa las cámaras superior e inferior está cubierto por una capa de una preparación de matriz extracelular (Matrigel). En este ensayo, la célula debe degradar la matriz para migrar hacia el estímulo quimiotáctico de la cámara inferior. Al cabo de 22 horas se cuantificaron las células que habían migrado a través del filtro y se calculó el índice quimiotáctico para cada condición (Figura 40B), sin que se observaran diferencias en la capacidad de invasión de las células HT1080.

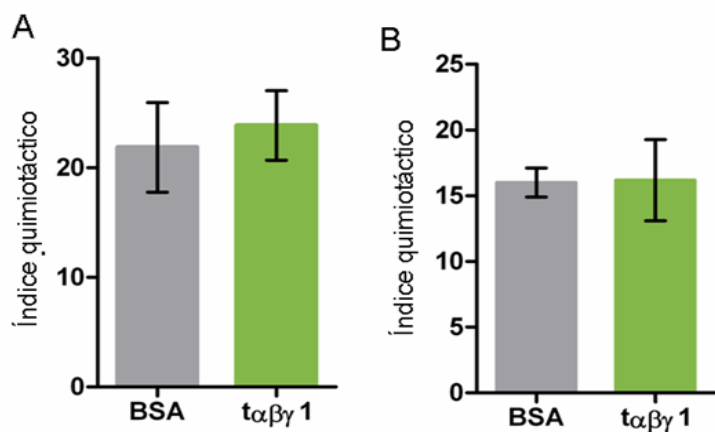


Figura 40. Ensayo de migración (A) y ensayo de invasión (B) de células HT1080 cultivadas durante 48 horas sobre placas tapizadas con BSA o  $t\alpha\beta\gamma 1$ .



# DISCUSIÓN



En este estudio hemos generado variantes truncadas de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  que comprenden el dominio *coiled-coil* completo de la LM-111. Cuando se expresa de forma individual, la cadena  $\alpha 1$  truncada se secreta eficientemente como monómero, mientras que las variantes truncadas de las cadenas  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  se secretan muy ineficientemente. Sin embargo, cuando las tres cadenas se expresan simultáneamente, se ensamblan eficientemente en un heterotrímero que es secretado al medio. Estos datos confirman estudios previos en los que se demostraba que la expresión de la cadena  $\alpha 1$  es esencial para la secreción de  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  (Yurchenco PD et al, 1997).

El análisis mediante transferencia *western* del fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma$  truncado ( $\alpha\beta\gamma 1$ ) purificado y su elución en un único pico en la cromatografía de exclusión molecular indican que las tres cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  truncadas se ensamblan en una estructura multimérica homogénea. Los ensayos de detección mediante luz láser dispersada (MALLS) sugieren la formación de un trímero, y el espectro de dicroísmo circular presenta el patrón típico de proteínas con una estructura predominantemente helicoidal. La discrepancia entre el tamaño molecular teórico y el observado mediante SDS-PAGE se puede atribuir a la presencia de numerosos sitios de glicosilación en las tres cadenas (Beck K et al, 1990).

Aunque el espectro de dicroísmo circular típico de una proteína con estructura helicoidal se caracteriza por presentar un mínimo a 222 nm más negativo que el de 208 nm (Dutta K et al, 2001), ésto sólo puede aplicarse a aquellas proteínas que presentan una estructura helicoidal próxima al 100% de su extensión. En el caso del fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  esto no sucede debido a la presencia regiones con estructura no *coiled-coil* en los extremos de las cadenas (Zimmerman T et al, 2007), lo que justifica que en el espectro de dicroísmo circular el mínimo aparezca a una longitud de onda de 208 nm. Estos resultados coinciden con los obtenidos recientemente por Macdonald *et al*, estudiando el potencial ensamblaje de la mitad carboxilo terminal (correspondiente al fragmento proteolítico E8) del fragmento *coiled-coil* de diferentes cadenas. El espectro de los fragmentos  $\alpha 3\beta 1\gamma 2$  y  $\alpha 3\beta 1\gamma 1$  muestra también un mínimo a 208 nm, y los autores calculan que el contenido helicoidal se corresponde al 75% del total (Macdonald PR et al, 2010). La formación del dominio *coiled-coil* se puede inferir de forma indirecta por su estructura predominantemente helicoidal y su forma alargada, que hace que se eluya de la columna de exclusión molecular a un volumen correspondiente a una masa molecular tres veces mayor.

Se puede concluir que las variantes truncadas de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  carentes de dominios globulares amino y carboxilo terminales son capaces de formar una estructura *coiled-coil* heterotrimérica, con independencia del resto de la molécula. Estos resultados son consistentes con estudios conformacionales realizados tanto con el fragmento E8 como con péptidos de unos 50 residuos que comprendían el extremo carboxilo terminal del dominio *coiled-coil*. Mezclas equimolares de estos péptidos mostraban una estructura helicoidal, aunque con una desnaturalización termal menos cooperativa que la observada con el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma$  purificado (Nomizu M et al, 1994; Utani A et al, 1994; Nomizu M et al, 1996).

Las LM ejercen múltiples funciones biológicas a través de interacciones con otras moléculas de la MEC y con receptores de la superficie celular (Kleinman HK et al, 1987; Beck K et al, 1990; Jones JC et al, 2000). Sin embargo, la mayoría de los sitios de unión a receptores celulares se han localizado en regiones distintas del dominio *coiled-coil*. Tradicionalmente a este dominio se le ha asignado un papel clave en el ensamblaje molecular, pero se ha considerado como “silente” desde el punto de vista funcional.

Mediante el empleo de sistemas de selección *in vitro* de repertorios de anticuerpos (Sanz L et al, 2001), nuestro grupo de investigación fue el primero en generar anticuerpos humanos recombinantes frente a diferentes regiones de la LM-111. La mayoría de los anticuerpos generados eran altamente específicos y algunos bloqueaban la interacción de diferentes tipos celulares con substratos proteicos ricos en LM-111. Uno de estos anticuerpos (L36) era capaz de modular el proceso de morfogénesis capilar *in vitro* e *in vivo*. Empleando diferentes técnicas de “mapeo” epitópico hemos modelado la región de la LM-111 reconocida por el anticuerpo L36 (Sanz L et al, 2003c). Esta región estaba localizada en el dominio heterotrimérico *coiled-coil*, y estaba formada por residuos de la cadena  $\alpha$  y de la cadena  $\gamma$  (Figura 9). El anticuerpo L36 se ensayó en un modelo tumoral murino donde se pudo comprobar que presentaba un claro efecto inhibidor del crecimiento tumoral (Sanz L et al, 2002). El notable efecto terapéutico observado en diferentes modelos animales indica que el anticuerpo L36 está bloqueando una interacción molecular (LM-111/célula endotelial) de gran transcendencia fisiológica, que modula el proceso de morfogénesis de la célula endotelial para formar estructuras capilares (Sanz L et al, 2002).

En este trabajo, confirmamos que el dominio *coiled-coil* de la LM-111 ejerce un papel funcional, y por primera vez demostramos que esta región regula procesos de adhesión y migración celular. Aunque las interacciones celulares con la MEC se han considerado generalmente como promotoras de adhesión celular (Chiquet-Ehrismann R, 1991),

nuestros resultados indican que el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  inhibe la adhesión celular y la morfología extendida, que se le suele asociar en diferentes tipos celulares (línea tumoral HT1080 y células endoteliales primarias). Igualmente, la interacción celular con el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  inhibe la formación de adhesiones focales, con la actina localizada fundamentalmente en estructuras “parcheadas” en el citoplasma y en los *ruffles* de la membrana.

Las propiedades anti-adhesivas de proteínas de MEC no se observan con frecuencia. Algunos ejemplos incluyen SPARC (del inglés *secreted protein acidic and rich in cysteine*, también conocida como BMP-40/osteonectina), trombospondina y tenascina (Chiquet-Ehrismann R, 1991). La modulación de la adhesión celular se asocia frecuentemente a fenómenos migratorios. La formación de filopodios y lamelipodios es clave en la migración celular, que depende también de la reorganización del citoesqueleto de actina. Como la disminución de las fibras de estrés y la formación de *ruffles* de membrana que observamos en las células tratadas con  $\alpha\beta\gamma 1$  son consistentes con la promoción de la migración celular, se podría especular que las propiedades antiadhesivas del dominio *coiled-coil* se hallan ligadas a la modulación de la migración en aquellos tejidos donde el dominio *coiled-coil* se encuentra accesible.

De hecho, el análisis del patrón de expresión génica de células HT1080 cultivadas sobre el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  inmovilizado puso en evidencia la regulación transcripcional de una serie de genes compatible con un fenotipo pro-migratorio y pro-invasivo. La metaloproteinasa MMP-2 es una de las principales responsables de la degradación proteolítica de la MEC, y tiene un papel determinante en la migración celular durante procesos tanto fisiológicos como patológicos (Bjorklund M et al, 2005). De hecho, tanto los niveles de MMP2 activa como la ratio pro-MMP2/MMP2 se consideran indicadores de metastasis (Schmalfeldt B et al, 2001). Recientemente, se ha descrito el papel de otra metaloproteinasa, MMP-13, como promotora de metástasis (Morrison C et al, 2011) y de invasión en cáncer de mama (Zhang S et al, 2007). Resulta muy interesante el hecho de que MIR21 (MicroRNA 21), cuya expresión aumenta en nuestro modelo experimental, se haya asociado a metastasis en una serie de neoplasias humanas al tener como dianas a inhibidores de metaloproteinasas (Gabriely G et al, 2008).

Varios componentes de la MEC cuya expresión es inducida por el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  están implicados en la regulación de la motilidad celular. Las proteínas matricelulares se expresan durante la regeneración tisular y están implicadas directamente en adhesión y migración. Con frecuencia, su expresión aberrante ha sido

asociada a progresión tumoral. La osteopontina (OSP1) es uno de los miembros mejor caracterizados de esta familia. Se ha asociado a diseminación de cáncer colorectal (Mole DJ et al, 2011), y es un mediador clave en la invasión del cáncer de próstata (Ding Z et al, 2011). Aunque no se pueda considerar estrictamente una proteína matricelular, el versicano (VCAN) es un componente de la MEC capaz de regular procesos celulares similares de adhesión, migración y proliferación. El versicano se ha asociado a mal pronóstico en diferentes tipos de tumores, y recientemente se ha descrito su implicación en el proceso metastático. Una alta expresión de versicano en el estroma peritumoral se asocia con metástasis en cáncer de próstata, y el versicano purificado promueve la motilidad de células tumorales in vitro (Ricciardelli C et al, 2007). Otra proteína de la MEC, MGP (del inglés, *matrix gla protein*) está sobreexpresada en glioblastomas y se asocia con un incremento en la migración y con peor pronóstico. Y a la inversa, el silenciamiento de MGP inhibe la migración de células de glioblastoma in vitro (van den BJ et al, 2003; Mertsch S et al, 2009). Uno de los genes cuya expresión disminuye tras la incubación con el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$  es MDA-7/IL-24. MDA-7 (del inglés, *melanoma differentiation associated gene-7*) es un miembro peculiar de la familia de la IL-10 que actúa como supresor tumoral y cuya expresión ectópica inhibe invasión y migración de células tumorales humanas (Patani N et al, 2010; Ramesh R et al, 2004). Los Wnts pertenecen a una familia de ligandos solubles que en humanos consta de 19 miembros y que regulan proliferación celular, diferenciación y movilidad en muchos procesos, desde el desarrollo embrionario hasta la tumorigénesis. En nuestro estudio, la expresión de Wnt5a se incrementa en presencia del fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$ . La señalización mediada por Wnt5a se ha implicado en invasión y en metástasis de varios tipos de cáncer; así, Wnt5a estimula *in vitro* la migración y la invasión de células de cáncer gástrico y su silenciamiento reduce el número de metástasis hepáticas in vivo en modelos inmunodeficientes (Yamamoto H et al, 2009). Otros genes cuya expresión aumenta en presencia del fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma 1$ , y que también se asocian con incremento de metástasis son OCR1 (del inglés, *ovarian cancer-related protein 1*) (Gao Y et al, 2005); NEDD9, (del inglés *neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9*, también conocida como HEF1/CAS-L), promotor de invasión en cáncer de mama (Kong C et al, 2011); MALAT1 (del inglés, *metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*) y GPNMB (glicoproteína NMB, HGFIN) (Rose AA et al, 2010).

No existen datos en la literatura sobre el análisis del perfil transcripcional de células cultivadas en presencia de LM (intacta o fragmentos). Mediante arrays de PCR, se ha demostrado que una preparación soluble de LM digerida con proteasas promueve la

regulación transcripcional en células de cáncer de mama. El patrón de expresión génica resultante sugiere un incremento en la capacidad invasiva de las células tumorales (Garamszegi N et al, 2009).

Las proteasas implicadas en remodelación tisular generan neo-epítomos a partir de los componentes de MEC que promueven cambios en el comportamiento celular. La interpretación más aceptada es que estos neo-epítomos actúan como ligandos solubles en el entorno pericelular e inducen cambios en la capacidad migratoria e invasiva de las células (Steadman R et al, 1993; Koshikawa N et al, 2004; Remy L et al, 2006). Nosotros proponemos que en la molécula de LM intacta las regiones “anti-adhesivas” del dominio *coiled-coil* son funcionalmente crípticas, o se encuentran neutralizadas por las regiones pro-adhesivas de los dominios globulares adyacentes. El procesamiento proteolítico de la LM y la liberación de los fragmentos globulares amino y carboxilo terminales permitiría decantar la balanza a favor de las regiones anti-adhesivas asociadas al dominio *coiled-coil*.

Se ha demostrado que la proteólisis de laminina-5 (LM332,  $\alpha3\beta3\gamma2$ ) por MMP-2 y MT1-MMP induce la migración de células epiteliales de mama (Giannelli G et al, 1997) y próstata (Udayakumar TS et al, 2003). El sitio de proteólisis (*cleavage*) precede dos cisteínas próximas en el dominio LEB de la cadena  $\gamma2$ , que están implicadas en la unión de las cadenas  $\alpha3$ -,  $\beta3$ - y  $\gamma2$ . Es de especial interés que mientras el fragmento amino terminal se libera, el fragmento carboxilo terminal permanece unido al heterotrímero (Giannelli G et al, 1997). Por tanto, la forma pro-migratoria de LM332, generada tras la proteólisis por MMP-2 contiene el dominio *coiled-coil* completo y los dominios pro-adhesivos LG carboxilo terminales de la cadena  $\alpha3$ . Esto podría explicar las diferencias en adhesión celular entre la LM332 proteolizada y el fragmento heterotrimérico  $\alpha\beta\gamma$  generado y caracterizado en este estudio, que carece de dominios LG. Proponemos que las funciones anti-adhesivas y pro-migratorias asociadas al procesamiento proteolítico de la laminina son “auto-limitantes”. Este procesamiento se iniciaría con la pérdida de los dominios globulares y terminaría con la degradación completa de la región *coiled-coil*. Nuestra hipótesis de que el dominio *coiled-coil* es menos sensible a la proteólisis que el resto de la molécula de LM-111, está apoyada por la reciente caracterización de los sitios sensibles a proteasas en esta molécula usando una aproximación proteómica (Doucet A et al, 2011). Más de dos tercios de los sitios de *cleavage* de diferentes proteasas (MMP-2, MMP-8 y MMP-9) están localizados fuera del dominio *coiled-coil*. Estos datos sugieren que la molécula intacta de laminina puede coexistir con dominios globulares (amino y carboxilo terminales) y dominios *coiled-coil* individualizados, en proporciones que varían según el contexto celular/tisular. Durante los procesos de

## DISCUSIÓN

desarrollo y reparación tisular puede haber un predominio temporal de dominios *coiled-coil* que promoverían la migración y la invasión celular. Podemos especular con que el patrón de expresión temporal de las proteasas asociadas a morfogénesis y regeneración determinaría una degradación “controlada” de las LM. Inicialmente, las regiones globulares periféricas se disociarían, mientras que el dominio *coiled-coil* mantendría su integridad estructural ( $LM^{LG-LCC+}$ ), hasta degradarse finalmente ( $LM^{LG-LCC-}$ ), desapareciendo el efecto pro-invasivo del dominio *coiled-coil*. En base a estos resultados, proponemos que en contextos patológicos concretos, como en el caso del cáncer, las proteasas del microambiente tumoral favorecerían un predominio local de variantes  $LM^{LG-LCC+}$  de laminina, promoviendo un comportamiento pro-invasivo (Figura 41).



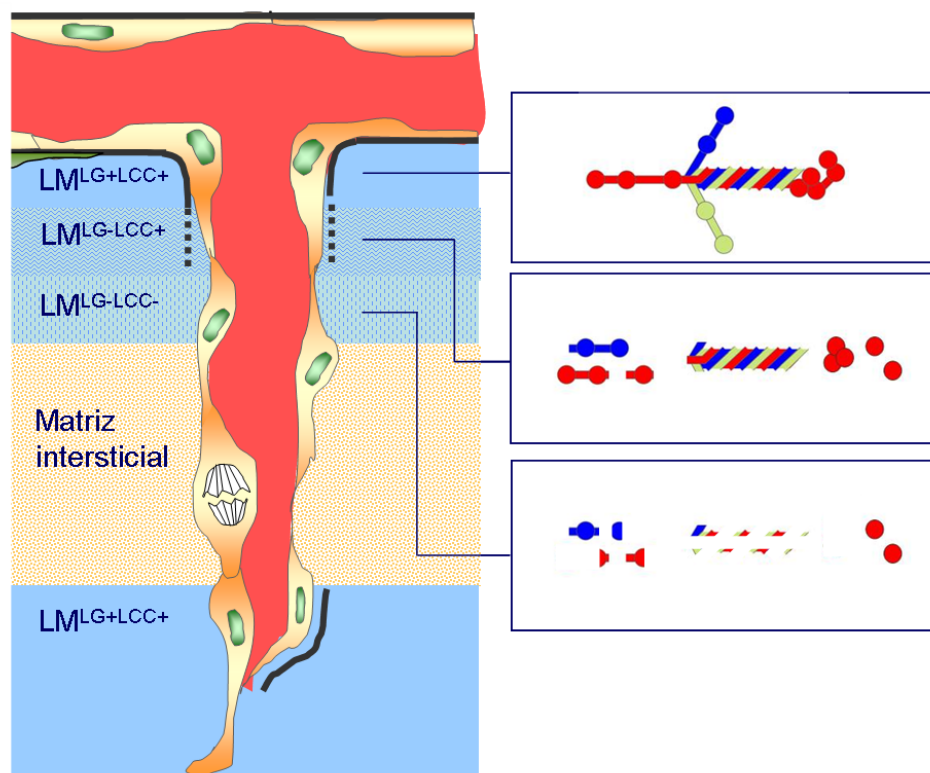


Figura 41. Modelo de degradación controlada de la LM. Prevalencia temporal de variantes  $LM^{LG-LCC+}$ , hasta su degradación definitiva por proteasas.



## CONCLUSIONES



- I. En este estudio hemos generado variantes truncadas de las cadenas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  de la LM que comprenden el dominio *coiled-coil* completo.
- II. Cuando se expresa de forma individual, la cadena  $\alpha 1$  truncada se secreta eficientemente, mientras que las variantes truncadas de las cadenas  $\beta 1$  y  $\gamma 1$  se secretan muy ineficientemente.
- III. Cuando las tres variantes truncadas se expresan simultáneamente, son capaces de formar una estructura *coiled-coil* heterotrimérica.
- IV. El fragmento *coiled-coil* heterotrimético ejerce un papel funcional, regulando procesos de adhesión y migración celular.
- V. El fragmento *coiled-coil* heterotrimético ejerce un efecto anti-adhesivo independiente de tipo celular, que se traduce en una reordenación en el citoesqueleto de actina.
- VI. La interacción del fragmento *coiled-coil* heterotrimético con receptores de membrana celular induce un perfil transcripcional compatible con un fenotipo pro-migratorio y pro-invasivo.
- VII. La degradación proteolítica de la LM-111 en determinados contextos podría dar lugar a un predominio localizado y limitado en el tiempo del dominio *coiled-coil* que promovería la invasión celular.
- VIII. Finalmente proponemos un modelo en el que las regiones “anti-adhesivas” del fragmento *coiled-coil* heterotrimético son funcionalmente crípticas, o se encuentran neutralizadas por las regiones pro-adhesivas de los dominios globulares adyacentes. El procesamiento proteolítico de la LM y la liberación de los fragmentos globulares amino y carboxilo terminales permitiría decantar la balanza a favor de las regiones anti-adhesivas asociadas al dominio *coiled-coil*.



## BIBLIOGRAFÍA





1. Alam N, Goel HL, Zarif MJ, Butterfield JE, Perkins HM, Sansoucy BG, Sawyer TK, Languino LR (2007). The integrin-growth factor receptor duet. *J. Cell Physiol* **213** (3): 649-653
2. Alvarez-Vallina L, Sanz L (2011). The therapeutic potential of engineered human neovessels for cell-based gene therapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* **11** (1): 67-76
3. Ashburner M (2000). A biologist's view of the Drosophila genome annotation assessment project. *Genome Res.* **10** (4): 391-393
4. Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der MK, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol.* **24** (5): 326-332
5. Barlow DP, Green NM, Kurkinen M, Hogan BL (1984). Sequencing of laminin B chain cDNAs reveals C-terminal regions of coiled-coil alpha-helix. *EMBO J.* **3** (10): 2355-2362
6. Beck K, Hunter I, Engel J (1990). Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* **4** (2): 148-160
7. Bjorklund M, Koivunen E (2005). Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1755** (1): 37-69
8. Blanco FJ, Rivas G, Serrano L (1994). A short linear peptide that folds into a native stable beta-hairpin in aqueous solution. *Nat. Struct. Biol.* **1** (9): 584-590
9. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* **390** (6658): 404-407
10. Bowman W (1840). On the minute structure and movements of voluntary muscle. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **130** ( 457-501

11. Bruckner P (2010). Suprastructures of extracellular matrices: paradigms of functions controlled by aggregates rather than molecules. *Cell Tissue Res.* **339** (1): 7-18
12. Bruckner-Tuderman L, von der MK, Pihlajaniemi T, Unsicker K (2010). Cell interactions with the extracellular matrix. *Cell Tissue Res.* **339** (1): 1-5
13. Carmignac V, Durbeej M (2012). Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.* **226** (2): 200-218
14. Cheng YS, Champlaud MF, Burgeson RE, Marinkovich MP, Yurchenco PD (1997). Self-assembly of laminin isoforms. *J. Biol. Chem.* **272** (50): 31525-31532
15. Chiquet-Ehrismann R (1991). Anti-adhesive molecules of the extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **3** (5): 800-804
16. Colognato H, Yurchenco PD (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* **218** (2): 213-234
17. Colognato-Pyke H, O'Rear JJ, Yamada Y, Carbonetto S, Cheng YS, Yurchenco PD (1995). Mapping of network-forming, heparin-binding, and alpha 1 beta 1 integrin-recognition sites within the alpha-chain short arm of laminin-1. *J. Biol. Chem.* **270** (16): 9398-9406
18. Conway JF, Parry DA (1991). Three-stranded alpha-fibrous proteins: the heptad repeat and its implications for structure. *Int. J. Biol. Macromol.* **13** (1): 14-16
19. Cukierman E, Bassi DE (2010). Physico-mechanical aspects of extracellular matrix influences on tumorigenic behaviors. *Semin. Cancer Biol.* **20** (3): 139-145
20. Davis GE, Senger DR (2005). Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.* **97** (11): 1093-1107
21. Ding Z, Wu CJ, Chu GC, Xiao Y, Ho D, Zhang J, Perry SR, Labrot ES, Wu X, Lis R, Hoshida Y, Hiller D, Hu B, Jiang S, Zheng H, Stegh AH, Scott KL, Signoretti S, Bardeesy N, Wang YA, Hill DE, Golub TR, Stampfer MJ, Wong WH, Loda M,

- Mucci L, Chin L, DePinho RA (2011). SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature* **470** (7333): 269-273
22. Doucet A, Overall CM (2011). Broad coverage identification of multiple proteolytic cleavage site sequences in complex high molecular weight proteins using quantitative proteomics as a complement to edman sequencing. *Mol. Cell Proteomics*. **10** (5): M110-
  23. DuFort CC, Paszek MJ, Weaver VM (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12** (5): 308-319
  24. Durbecq M (2010). Laminins. *Cell Tissue Res.* **339** (1): 259-268
  25. Dutta K, Alexandrov A, Huang H, Pascal SM (2001). pH-induced folding of an apoptotic coiled coil. *Protein Sci.* **10** (12): 2531-2540
  26. Ekblom P, Alitalo K, Vaheri A, Timpl R, Saxen L (1980). Induction of a basement membrane glycoprotein in embryonic kidney: possible role of laminin in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77** (1): 485-489
  27. Fahey B, Degnan BM (2012). Origin and evolution of laminin gene family diversity. *Mol. Biol. Evol.*
  28. Ferrara N (2010). Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing: two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action. *Mol. Biol. Cell* **21** (5): 687-690
  29. Folkman J (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* **175** (3): 409-416
  30. Forcet C, Stein E, Pays L, Corset V, Llambi F, Tessier-Lavigne M, Mehlen P (2002). Netrin-1-mediated axon outgrowth requires deleted in colorectal cancer-dependent MAPK activation. *Nature* **417** (6887): 443-447
  31. Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM (2008). MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol. Cell Biol.* **28** (17): 5369-5380

32. Gagnoux-Palacios L, Allegra M, Spirito F, Pommeret O, Romero C, Ortonne JP, Meneguzzi G (2001). The short arm of the laminin gamma2 chain plays a pivotal role in the incorporation of laminin 5 into the extracellular matrix and in cell adhesion. *J. Cell Biol.* **153** (4): 835-850
33. Gao Y, Yue W, Zhang P, Li L, Xie X, Yuan H, Chen L, Liu D, Yan F, Pei X (2005). Spindlin1, a novel nuclear protein with a role in the transformation of NIH3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **335** (2): 343-350
34. Garamszegi N, Garamszegi SP, Shehadeh LA, Scully SP (2009). Extracellular matrix-induced gene expression in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **7** (3): 319-329
35. Geiger B, Yamada KM (2011). Molecular architecture and function of matrix adhesions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (5):
36. Ghosh S, Stack MS (2000). Proteolytic modification of laminins: functional consequences. *Microsc. Res. Tech.* **51** (3): 238-246
37. Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277** (5323): 225-228
38. Goodman SL, Risse G, von der MK (1989). The E8 subfragment of laminin promotes locomotion of myoblasts over extracellular matrix. *J. Cell Biol.* **109** (2): 799-809
39. Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P (2012). Interstitial guidance of cancer invasion. *J. Pathol.* **226** (2): 185-199
40. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev.* **85** (3): 979-1000
41. Hamill KJ, Kligys K, Hopkinson SB, Jones JC (2009). Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J. Cell Sci.* **122** (Pt 24): 4409-4417

42. Hawinkels LJ, Zuidwijk K, Verspaget HW, de Jonge-Muller ES, van DW, Ferreira V, Fontijn RD, David G, Hommes DW, Lamers CB, Sier CF (2008). VEGF release by MMP-9 mediated heparan sulphate cleavage induces colorectal cancer angiogenesis. *Eur. J. Cancer* **44** (13): 1904-1913
43. Heino J, Kapyla J (2009). Cellular receptors of extracellular matrix molecules. *Curr. Pharm. Des* **15** (12): 1309-1317
44. Hunter I, Schulthess T, Bruch M, Beck K, Engel J (1990). Evidence for a specific mechanism of laminin assembly. *Eur. J. Biochem.* **188** (2): 205-211
45. Hynes RO (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* **326** (5957): 1216-1219
46. Iyer AK, Tran KT, Borysenko CW, Cascio M, Camacho CJ, Blair HC, Bahar I, Wells A (2007). Tenascin cytotactin epidermal growth factor-like repeat binds epidermal growth factor receptor with low affinity. *J. Cell Physiol* **211** (3): 748-758
47. Jones JC, Dehart GW, Gonzales M, Goldfinger LE (2000). Laminins: an overview. *Microsc. Res. Tech.* **51** (3): 211-213
48. Kalluri R (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3** (6): 422-433
49. Kammerer RA, Antonsson P, Schulthess T, Fauser C, Engel J (1995). Selective chain recognition in the C-terminal alpha-helical coiled-coil region of laminin. *J. Mol. Biol.* **250** (1): 64-73
50. Kammerer RA, Schulthess T, Landwehr R, Schumacher B, Lustig A, Yurchenco PD, Ruegg MA, Engel J, Denzer AJ (1999). Interaction of agrin with laminin requires a coiled-coil conformation of the agrin-binding site within the laminin gamma1 chain. *EMBO J.* **18** (23): 6762-6770
51. Kerbel R, Folkman J (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* **2** (10): 727-739

52. Kizuka Y, Kobayashi K, Kakuda S, Nakajima Y, Itoh S, Kawasaki N, Oka S (2008). Laminin-1 is a novel carrier glycoprotein for the nonsulfated HNK-1 epitope in mouse kidney. *Glycobiology* **18** (4): 331-338
53. Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, Hassell JR, Aumailley M, Terranova VP, Martin GR, DuBois-Dalcq M (1985). Biological activities of laminin. *J. Cell Biochem.* **27** (4): 317-325
54. Kleinman HK, Graf J, Iwamoto Y, Kitten GT, Ogle RC, Sasaki M, Yamada Y, Martin GR, Luckenbill-Edds L (1987). Role of basement membranes in cell differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **513** ( 134-145
55. Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* **25** (2): 312-318
56. Kleppel MM, Kashtan CE, Butkowski RJ, Fish AJ, Michael AF (1987). Alport familial nephritis. Absence of 28 kilodalton non-collagenous monomers of type IV collagen in glomerular basement membrane. *J. Clin. Invest* **80** (1): 263-266
57. Kong C, Wang C, Wang L, Ma M, Niu C, Sun X, Du J, Dong Z, Zhu S, Lu J, Huang B (2011). NEDD9 is a positive regulator of epithelial-mesenchymal transition and promotes invasion in aggressive breast cancer. *PLoS. One.* **6** (7): e22666-
58. Koshikawa N, Schenk S, Moeckel G, Sharabi A, Miyazaki K, Gardner H, Zent R, Quaranta V (2004). Proteolytic processing of laminin-5 by MT1-MMP in tissues and its effects on epithelial cell morphology. *FASEB J.* **18** (2): 364-366
59. Kruegel J, Miosge N (2010). Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol. Life Sci.* **67** (17): 2879-2895
60. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ (1988). Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.* **107** (4): 1589-1598
61. LeBleu VS, Macdonald B, Kalluri R (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp. Biol. Med. (Maywood. )* **232** (9): 1121-1129

62. Li S, Edgar D, Fassler R, Wadsworth W, Yurchenco PD (2003). The role of laminin in embryonic cell polarization and tissue organization. *Dev. Cell* **4** (5): 613-624
63. Macdonald PR, Lustig A, Steinmetz MO, Kammerer RA (2010). Laminin chain assembly is regulated by specific coiled-coil interactions. *J. Struct. Biol.* **170** (2): 398-405
64. Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, Holthaus KA, Grunkemeyer JA, Ericksen MB, Hopfer H, Xiao Y, Stillman IE, Kalluri R (2000). Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J. Biol. Chem.* **275** (28): 21340-21348
65. Marneros AG, Olsen BR (2001). The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* **20** (5-6): 337-345
66. Martin GR, Timpl R, Kuhn K (1988). Basement membrane proteins: molecular structure and function. *Adv. Protein Chem.* **39** (1-50)
67. McKee KK, Harrison D, Capizzi S, Yurchenco PD (2007). Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J. Biol. Chem.* **282** (29): 21437-21447
68. Mertsch S, Schurgers LJ, Weber K, Paulus W, Senner V (2009). Matrix gla protein (MGP): an overexpressed and migration-promoting mesenchymal component in glioblastoma. *BMC. Cancer* **9** (302-)
69. Miner JH (2003). Of laminins and delamination in Alport syndrome. *Kidney Int.* **63** (3): 1158-1159
70. Miner JH, Li C (2000). Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane. *Dev. Biol.* **217** (2): 278-289
71. Miner JH, Yurchenco PD (2004). Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20** (255-284)

72. Mohammadi M, Olsen SK, Goetz R (2005). A protein canyon in the FGF-FGF receptor dimer selects from an a la carte menu of heparan sulfate motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15** (5): 506-516
73. Mole DJ, O'Neill C, Hamilton P, Olabi B, Robinson V, Williams L, Diamond T, El-Tanani M, Campbell FC (2011). Expression of osteopontin coregulators in primary colorectal cancer and associated liver metastases. *Br. J. Cancer* **104** (6): 1007-1012
74. Morrison C, Mancini S, Cipollone J, Kappelhoff R, Roskelley C, Overall C (2011). Microarray and proteomic analysis of breast cancer cell and osteoblast co-cultures: role of osteoblast matrix metalloproteinase (MMP)-13 in bone metastasis. *J. Biol. Chem.* **286** (39): 34271-34285
75. Nomizu M, Kim WH, Yamamura K, Utani A, Song SY, Otaka A, Roller PP, Kleinman HK, Yamada Y (1995). Identification of cell binding sites in the laminin alpha 1 chain carboxyl-terminal globular domain by systematic screening of synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **270** (35): 20583-20590
76. Nomizu M, Otaka A, Utani A, Roller PP, Yamada Y (1994). Assembly of synthetic laminin peptides into a triple-stranded coiled-coil structure. *J. Biol. Chem.* **269** (48): 30386-30392
77. Nomizu M, Utani A, Beck K, Otaka A, Roller PP, Yamada Y (1996). Mechanism of laminin chain assembly into a triple-stranded coiled-coil structure. *Biochemistry* **35** (9): 2885-2893
78. O'Grady P, Thai TC, Saito H (1998). The laminin-nidogen complex is a ligand for a specific splice isoform of the transmembrane protein tyrosine phosphatase LAR. *J. Cell Biol.* **141** (7): 1675-1684
79. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88** (2): 277-285
80. Patarroyo M, Tryggvason K, Virtanen I (2002). Laminin isoforms in tumor invasion, angiogenesis and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* **12** (3): 197-207



81. Ponce ML, Nomizu M, Delgado MC, Kuratomi Y, Hoffman MP, Powell S, Yamada Y, Kleinman HK, Malinda KM (1999). Identification of endothelial cell binding sites on the laminin gamma 1 chain. *Circ. Res.* **84** (6): 688-694
82. Poschl E, Schlotzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131** (7): 1619-1628
83. Rajeevan MS, Ranamukhaarachchi DG, Vernon SD, Unger ER (2001). Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies. *Methods* **25** (4): 443-451
84. Remy L, Trespeuch C, Bachy S, Scoazec JY, Rousselle P (2006). Matrilysin 1 influences colon carcinoma cell migration by cleavage of the laminin-5 beta3 chain. *Cancer Res.* **66** (23): 11228-11237
85. Ricciardelli C, Russell DL, Ween MP, Mayne K, Suwiwat S, Byers S, Marshall VR, Tilley WD, Horsfall DJ (2007). Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix by prostate cancer cells promotes cell motility. *J. Biol. Chem.* **282** (14): 10814-10825
86. Rose AA, Grosset AA, Dong Z, Russo C, Macdonald PA, Bertos NR, St-Pierre Y, Simantov R, Hallett M, Park M, Gaboury L, Siegel PM (2010). Glycoprotein nonmetastatic B is an independent prognostic indicator of recurrence and a novel therapeutic target in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **16** (7): 2147-2156
87. Rowe RG, Weiss SJ (2008). Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* **18** (11): 560-574
88. Rozario T, DeSimone DW (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* **341** (1): 126-140
89. Sanchez-Martin D, Cuesta AM, Fogal V, Ruoslahti E, Alvarez-Vallina L (2011). The multicompartmental p32/gClqR as a new target for antibody-based tumor targeting strategies. *J. Biol. Chem.* **286** (7): 5197-5203

90. Sanz L, Alvarez-Vallina L (2003a). The extracellular matrix: a new turn-of-the-screw for anti-angiogenic strategies. *Trends Mol. Med.* **9** (6): 256-262
91. Sanz L, Compte M, Guijarro-Munoz I, Alvarez-Vallina L (2012). Non-hematopoietic stem cells as factories for in vivo therapeutic protein production. *Gene Ther.* **19** (1): 1-7
92. Sanz L, Feijoo M, Blanco B, Serrano A, Alvarez-Vallina L (2003b). Generation of non-permissive basement membranes by anti-laminin antibody fragments produced by matrix-embedded gene-modified cells. *Cancer Immunol. Immunother.* **52** (10): 643-647
93. Sanz L, Garcia-Bermejo L, Blanco FJ, Kristensen P, Feijoo M, Suarez E, Blanco B, Alvarez-Vallina L (2003c). A novel cell binding site in the coiled-coil domain of laminin involved in capillary morphogenesis. *EMBO J.* **22** (7): 1508-1517
94. Sanz L, Kristensen P, Blanco B, Fecteau S, Russell SJ, Winter G, Alvarez-Vallina L (2002). Single-chain antibody-based gene therapy: inhibition of tumor growth by in situ production of phage-derived human antibody fragments blocking functionally active sites of cell-associated matrices. *Gene Ther.* **9** (15): 1049-1053
95. Sanz L, Kristensen P, Russell SJ, Ramirez G, Jr., Alvarez-Vallina L (2001). Generation and characterization of recombinant human antibodies specific for native laminin epitopes: potential application in cancer therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **50** (10): 557-565
96. Sanz L, Alvarez-Vallina L (2005). Antibody-based antiangiogenic cancer therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets.* **9** (6): 1235-1245
97. Sarras MP, Jr., Yan L, Gress A, Zhang X, Agbas A, Huff JK, St John PL, Abrahamson DR (1994). Cloning and biological function of laminin in *Hydra vulgaris*. *Dev. Biol.* **164** (1): 312-324
98. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (7):
99. Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzmann R, Yamada Y (1988). Laminin, a multidomain protein. The A chain has a unique globular domain and homology

- with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J. Biol. Chem.* **263** (32): 16536-16544
100. Sasaki M, Yamada Y (1987). The laminin B2 chain has a multidomain structure homologous to the B1 chain. *J. Biol. Chem.* **262** (35): 17111-17117
  101. Scheele S, Nystrom A, Durbeej M, Talts JF, Ekblom M, Ekblom P (2007). Laminin isoforms in development and disease. *J. Mol. Med. (Berl)* **85** (8): 825-836
  102. Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, Fridman R, Berger U, Schmitt M, Kuhn W, Lengyel E (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **7** (8): 2396-2404
  103. Simon-Assmann P, Orend G, Mammadova-Bach E, Spenle C, Lefebvre O (2011). Role of laminins in physiological and pathological angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **55** (4-5): 455-465
  104. Steadman R, Irwin MH, St John PL, Blackburn WD, Heck LW, Abrahamson DR (1993). Laminin cleavage by activated human neutrophils yields proteolytic fragments with selective migratory properties. *J. Leukoc. Biol.* **53** (4): 354-365
  105. Stipp CS (2010). Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert. Rev. Mol. Med.* **12** ( e3-
  106. Suzuki N, Yokoyama F, Nomizu M (2005). Functional sites in the laminin alpha chains. *Connect. Tissue Res.* **46** (3): 142-152
  107. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979). Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.* **254** (19): 9933-9937
  108. Timpl R, Sasaki T, Kostka G, Chu ML (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4** (6): 479-489
  109. Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol.* **19** (4): 309-317

110. Tzu J, Marinkovich MP (2008). Bridging structure with function: structural, regulatory, and developmental role of laminins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40** (2): 199-214
111. Udayakumar TS, Chen ML, Bair EL, Von B, Cress AE, Nagle RB, Bowden GT (2003). Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration. *Cancer Res.* **63** (9): 2292-2299
112. Utani A, Nomizu M, Timpl R, Roller PP, Yamada Y (1994). Laminin chain assembly. Specific sequences at the C terminus of the long arm are required for the formation of specific double- and triple-stranded coiled-coil structures. *J. Biol. Chem.* **269** (29): 19167-19175
113. Vaday GG, Lider O (2000). Extracellular matrix moieties, cytokines, and enzymes: dynamic effects on immune cell behavior and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **67** (2): 149-159
114. van den BJ, Wolter M, Kuick R, Misek DE, Youkilis AS, Wechsler DS, Sommer C, Reifemberger G, Hanash SM (2003). Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* **163** (3): 1033-1043
115. Vempati P, Mac GF, Popel AS (2010). Quantifying the proteolytic release of extracellular matrix-sequestered VEGF with a computational model. *PLoS. One.* **5** (7): e11860-
116. Whittaker CA, Bergeron KF, Whittle J, Brandhorst BP, Burke RD, Hynes RO (2006). The echinoderm adhesome. *Dev. Biol.* **300** (1): 252-266
117. Wieslander J, Barr JF, Butkowski RJ, Edwards SJ, Bygren P, Heinegard D, Hudson BG (1984). Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane: localization to noncollagenous regions of type IV collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81** (12): 3838-3842

118. Yamamoto H, Kitadai Y, Yamamoto H, Oue N, Ohdan H, Yasui W, Kikuchi A (2009). Laminin gamma2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterology* **137** (1): 242-52, 252
119. Yurchenco PD (2011). Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3** (2):
120. Yurchenco PD, Cheng YS (1993). Self-assembly and calcium-binding sites in laminin. A three-arm interaction model. *J. Biol. Chem.* **268** (23): 17286-17299
121. Yurchenco PD, Cheng YS, Colognato H (1992). Laminin forms an independent network in basement membranes. *J. Cell Biol.* **117** (5): 1119-1133
122. Yurchenco PD, Patton BL (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr. Pharm. Des* **15** (12): 1277-1294
123. Yurchenco PD, Quan Y, Colognato H, Mathus T, Harrison D, Yamada Y, O'Rear JJ (1997). The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94** (19): 10189-10194
124. Zhang S, Zhang D, Sun B (2007). Vasculogenic mimicry: current status and future prospects. *Cancer Lett.* **254** (2): 157-164
125. Zimmerman T, Blanco FJ (2007). The coiled-coil structure potential of the laminin LCC domain is very fragmented and does not differentiate between natural and non-detected isoforms. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **24** (4): 413-420



## ANEXO





## ANEXO: ARTICULOS PUBLICADOS, PATENTES.Y MODELOS DE UTILIDAD

Durante el desarrollo de esta Investigación se han generado una serie de resultados que han sido recogidos en una serie de artículos y de patentes cuyas referencias aparecen aquí indicadas. Aquellas publicaciones que están directamente relacionadas y forman parte de esta Tesis Doctoral, aparecen completas a continuación.

### ARTÍCULOS PUBLICADOS

Sanz L, **Santos-Valle P**, Alonso-Camino V, Salas C, Serrano A, Vicario JL, Cuesta AM, Compte M, Sánchez-Martín D, Álvarez-Vallina L (2008). “Long term *in vivo* imaging of human angiogenesis: critical role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the generation of durable blood vessels”. Microvascular Research, 75 (3) 308-314.

Compte M, Alonso-Camino V, **Santos-Valle P**, Cuesta AM, Sánchez-Martín D, Rodríguez López M, Vicario JL, Sanz L and Álvarez-Vallina L (2010). “Factory Neovessels: Engineered Human Blood Vessels Secreting Therapeutic Proteins as a new Drug Delivery System”. Gene Therapy 17(6) 745-51

Alonso-Camino V, **Santos-Valle P**, Ispizua MC, Sanz L and Álvarez-Vallina L (2011). “Engineered Human Tumor Xenografts with Functional Human Vascular Networks”. Microvascular Research 81 (1) 18-25

**Santos-Valle P**, Guijarro-Muñoz I, Cuesta MA, Alonso-Camino V, Maider Villate, Álvarez-Cienfuegos A, Blanco FJ, Laura Sanz and Álvarez-Vallina L (*in press*). “The heterotrimeric laminin coiled-coil domain exert an anti-adhesive effects and induces a pro-invasive phenotype” Plos One (en prensa)

### PATENTES Y MODELOS DE UTILIDAD

Patente: *Modelo Animal de Angiogénesis Humana y sus aplicaciones*.

Inventores (p.o. de firma): Luis Álvarez-Vallina, Laura Sanz Alcober, **Patricia Santos-Valle**, Vanesa Alonso-Camino, Ángel Cuesta Martínez, Marta Compte Grau, David Sánchez-Martín, Felix Bonilla Velasco.

Número de solicitud: P200800077

Entidad titular: FUAM



